

Departement für Nutztiere der Vetsuisse-Fakultät  
Universität Zürich

Klinik für Fortpflanzungsmedizin  
(Direktor: Prof. Dr. W. Kähn) und

Nationalgestüt Avenches  
(Direktor: Dr. P. A. Poncet)

Arbeit unter der Leitung von PD Dr. F. Janett

**Auswirkungen einer GnRH-Vakzine (Equity®) auf  
Hodenfunktion und Sexualverhalten  
beim Hengst**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Vetsuisse-Fakultät  
Universität Zürich

vorgelegt von

**Reto Stump**

Tierarzt

von Erlen, TG

Genehmigt auf Antrag von  
Prof. Dr. R. Thun, Referent  
Prof. Dr. F. Ehrensperger, Korreferent

Zürich 2008

<b>1.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>3</b>
<b>3.</b>	<b>EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG</b>	<b>5</b>
3.1.	Chirurgische Kastration	5
3.2.	Hormonale Kastration	6
3.3.	Immunologische Kastration	7
<b>4.</b>	<b>TIERE, MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>9</b>
4.1.	Tiere	9
4.2.	Versuchsanordnung	9
4.3.	Bestimmung von Testosteron und GnRH-Antikörpertiter	9
4.4.	Samengewinnung	10
4.5.	Untersuchungen im Frischsamen	10
4.5.1.	Volumen	10
4.5.2.	Dichte	10
4.5.3.	Gesamtspermienzahl	10
4.5.4.	Spermienmotilität	11
4.5.5.	Spermienmorphologie	11
4.6.	Skrotalweite	12
4.7.	Verhalten und Libido	12
4.8.	Wirkungseintritt und Reversibilität	12

<b>5.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>13</b>
<b>5.1.</b>	<b>Verträglichkeit der Impfung</b>	<b>13</b>
<b>5.2.</b>	<b>Testosteron</b>	<b>13</b>
<b>5.3.</b>	<b>GnRH-Antikörpertiter</b>	<b>16</b>
<b>5.4.</b>	<b>Skrotalweite</b>	<b>17</b>
<b>5.5.</b>	<b>Samenqualität</b>	<b>18</b>
5.5.1.	Volumen	18
5.5.2.	Dichte	18
5.5.3.	Gesamtspermienzahl	19
5.5.4.	Totale Motilität	26
5.5.5.	Progressive Motilität	26
5.5.6.	Normale Spermien	31
5.5.7.	Spermien mit Hauptdefekten	31
<b>5.6.</b>	<b>Verhalten und Libido</b>	<b>36</b>
<b>5.7.</b>	<b>Wirkungseintritt und Reversibilität</b>	<b>36</b>
<b>6.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>37</b>
<b>7.</b>	<b>APPENDIX</b>	<b>41</b>
<b>7.1.</b>	<b>Hancock Lösung</b>	<b>41</b>
<b>7.2.</b>	<b>Morphologisches Klassifikationsschema</b>	<b>42</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>43</b>
<b>9.</b>	<b>DANK</b>	<b>49</b>

## 1. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Auswirkungen einer anti-GnRH-Vakzine auf die Testosteronsekretion, den Antikörpertiter, die Skrotalweite, die Samenqualität und das Geschlechtsverhalten beim Hengst abzuklären. Unerwünschte Nebenwirkungen der Impfung wurden ebenfalls ausgewertet. Für die Studie standen 8 klinisch gesunde und fruchtbare Hengste (7 Freiberger, 1 Warmblut) zwischen 6 und 15 Jahren zur Verfügung. Fünf Tiere erhielten 3 mal im Abstand von 4 bzw. 8 Wochen 200µg eines GnRH-Protein-Konjugates (Equity<sup>®</sup>, CSL Limited, Australia) intramuskulär verabreicht und 3 Kontrolltiere wurden mit der gleichen Menge physiol. Kochsalzlösung behandelt. Die Bestimmung von Testosteron und des GnRH-Antikörpertiters im Blut sowie die Beurteilung von Samenqualität und Libido erfolgten wöchentlich während eines Jahres. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Testosteronwerte bei 4 von 5 der mit Equity<sup>®</sup> geimpften Hengsten im Anschluss an die 2. Impfung deutlich abnahmen und während mindestens 6 Monaten unterdrückt blieben. Zwei Hengste erreichten noch vor Ende des Versuches wieder Ausgangswerte und bei einem weiteren Hengst hatte die Impfung keinen Effekt auf den Plasma-Testosterongehalt. Die Antikörpertiter erreichten bei allen 5 Hengsten innerhalb von zwei Wochen nach der 3. Impfung individuell unterschiedliche Höchstwerte, die im Verlaufe des Versuches wieder langsam abfielen. Fünf Wochen nach der 2. Impfung begannen sich die Hoden während rund 7 Monaten zu verkleinern, erreichten aber bis Versuchsende wieder normale Grösse wie die Kontrolltiere. Alle geimpften Hengste zeigten eine Verschlechterung der Samenqualität, die sich gegen Ende des Versuches wieder erholte. Vier Hengste zeigten nach der Impfung eine deutliche Hemmung der Libido, die sich bei 2 Tieren vor Ende der Studie wieder normalisierte. Bei den übrigen beiden Hengsten blieb das Desinteresse gegenüber Stuten länger als ein Jahr bestehen. Wir schliessen aus unseren Untersuchungen, dass Equity<sup>®</sup> beim Hengst gut verträglich ist und eine mindestens 6-monatige Unterdrückung der Testosteronsekretion mit Verschlechterung der Samenqualität und Abnahme der Libido bewirken kann. Die supprimierende Wirkung von Equity<sup>®</sup> auf die Geschlechtsfunktion ist individuell verschieden und kann länger als ein Jahr anhalten.

---

## 2. Summary

The aim of the present investigation was to determine the effects of an anti-GnRH-vaccine on testosterone secretion, antibody titers, scrotal width, semen quality and sexual behavior in the stallion. Adverse reactions to the vaccine were also evaluated. For this study 8 clinically healthy and fertile stallions (7 Franches-Montagnes, 1 Warmblood) aged between 6 and 15 years were used. Five stallions were immunized 3 times at an interval of 4 and 8 weeks, respectively, with 200µg of a GnRH-protein conjugate (Equity<sup>®</sup>, CSL Limited, Australia) intramuscularly in the neck and 3 control animals received an equivalent volume of saline solution. Plasma testosterone concentration and GnRH antibody titer as well as evaluation of semen quality and libido were determined weekly during one year. Our results demonstrate that in 4 stallions testosterone values started to decrease after the second vaccination and remained suppressed for at least 6 months. In 2 stallions prevaccination concentrations were obtained before the end of the experiment and in one stallion vaccination had no effect on plasma testosterone concentrations. Antibody titers varied individually in all 5 stallions and after peak values within 2 weeks after the third vaccination they slowly decreased until the end of the experiment. Five weeks after the second vaccination scrotal size started to decrease for about 7 months in all stallions but regained size of control animals at the end of the study. In all stallions semen quality continuously decreased after vaccination but all parameters improved towards the end of the experiment. In 4 stallions libido was clearly impaired after immunization but normalized in 2 animals before the study was finished. In the remaining two stallions the lack of interest for mares lasted longer than one year. From our experiments we conclude that immunization with Equity<sup>®</sup> is well tolerated in the stallion and may effectively suppress testosterone secretion for at least 6 months with a decrease in semen quality and libido. The inhibiting activity of Equity<sup>®</sup> on sexual function is individually different and can last for more than one year.

### **3. Einleitung und Fragestellung**

In der Pferdepraxis ist die Unterdrückung der Fortpflanzungsfunktion ein häufig geäußertes Anliegen. Beim Hengst geht es in erster Linie darum, den unerwünschten Geschlechtstrieb und das aggressive Verhalten Artgenossen aber auch Menschen gegenüber auszuschalten. Damit wird die Haltung, insbesondere von älteren Hengsten sicherer und unnötige Gefahren können dadurch vermieden werden. Ein weiterer Vorteil der Kontrolle des Sexualverhaltens besteht darin, dass Sporthengste im Training oder während des Wettkampfes durch anwesende Stuten nicht dauernd abgelenkt werden und ihr Leistungsvermögen vollumfänglich ausgeschöpft werden kann. Zur Ausschaltung der Fruchtbarkeit und des Geschlechtstribs stehen im Wesentlichen drei verschiedene Methoden zur Auswahl, nämlich die chirurgische, die hormonale und die immunologische Kastration (Stout, 2004).

#### **3.1. Chirurgische Kastration**

Die chirurgische Kastration (Gonadektomie) wird heute am häufigsten angewendet. Mit dem Entfernen beider Hoden wird die Testosternquelle mit grosser Sicherheit entfernt, doch ist die Methode irreversibel und deshalb können im Sport erfolgreiche und wertvolle Hengste später nicht mehr in der Zucht eingesetzt werden. Je nach Alter des Tieres, Risikobereitschaft des Besitzers (und des Tierarztes) sowie vorhandenen technischen Einrichtungen kann der operative Eingriff entweder am stehenden (unter Sedation und Lokalanästhesie) oder liegenden Tier (in Vollnarkose) durchgeführt werden. Bei der bedeckten Kastration wird der Processus vaginalis nicht eröffnet bzw. wieder verschlossen, während er bei unbedeckter Kastration offen bleibt. Seit einigen Jahren steht auch die laparoskopische Kastration (Kellewald, 2005) zur Verfügung, bei der die Hoden üblicherweise nicht entfernt werden, sondern es wird lediglich eine Unterbrechung der Blutzufuhr und allenfalls ein Verschluss des Samenleiters angestrebt. Diese chirurgisch anspruchsvolle Methode eignet sich besonders bei Kryptorchiden. Wie bei jeder Operation dürfen chirurgisches Risiko sowie mögliche Komplikationen, besonders bei älteren Tieren, nicht vernachlässigt

werden. Zudem ist bekannt, dass die chirurgische Kastration zur Unterdrückung des Sexualverhaltens nicht in jedem Fall erfolgreich ist (Line et al., 1985).

### **3.2. Hormonale Kastration**

Eine effiziente nicht invasive Alternative zur chirurgischen Kastration besteht in der Verabreichung von Progestagenen, die durch negative Feedback-Wirkung auf Hypothalamus und Hypophyse die Sekretion von Gonadotropin-Releasinghormon (GnRH) sowie LH unterdrücken und in der Folge auch die Freisetzung von Testosteron aus dem Hoden hemmen. Neben einer verminderten Testosteronproduktion und Dämpfung des Sexualverhaltens führt die Applikation von Progestagenen auch zu einer Beruhigung des Tieres (Perkins, 2004), deutlich erkennbar, wenn aggressive Wallache zum Beispiel mit Altrenogest (Regumate®) behandelt werden (McDonnell, 2003). Aufgrund der täglichen Verabreichungsart, der hohen Dosierung (doppelt so hoch wie bei der Stute) mit entsprechend hohen Kosten, aber auch wegen fehlenden Angaben über die effektiv notwendigen Wirkungsmengen und die möglichen Nebenwirkungen einer Langzeitbehandlung hat diese Form der Kastration keinen Eingang in die Praxis gefunden. Ausserdem darf nicht vergessen werden, dass Progestagene unter Doping fallen und wenn die Pferde als Nutztiere deklariert werden, müssen auch die Fleischrückstandsvorschriften eingehalten werden.

Eine weitere Möglichkeit, das aggressive Verhalten und die Fruchtbarkeit von Haustieren zu unterdrücken, besteht in der Verabreichung von GnRH-Agonisten, die in hoher Dosierung und bei entsprechend langer Applikationsdauer zu einer „Down-Regulierung“ (Desensibilisierung) der Hypophyse mit anschliessend verminderter LH-Sekretion führen. Dieser Mechanismus ist aber stark speziesspezifisch und bisherige Untersuchungen beim Hengst haben keine (Brinsko et al., 1998) oder sogar eine gegenteilige Wirkung (Roser und Hughes, 1991; Sieme et al., 2004) gezeigt. Neben Agonisten wurden auch GnRH-Antagonisten zur kompetitiven Hemmung von GnRH-Rezeptoren eingesetzt, doch hat sich auch hier herausgestellt, dass zum Beispiel Antarelix® auf die Libido adulter Hengste keine Wirkung hat (Fortier et al., 2002) und die Behandlung mit hohen Kosten verbunden ist. Während die Anwendung von Hormonen oder Hormonagonisten in der Praxis nicht immer befriedigend ist, stellen

immunologische Methoden eine echte Alternative zu den chirurgischen Methoden dar.

### **3.3. Immunologische Kastration**

Aufgrund der oben dargestellten Nachteile der chirurgischen (irreversibler Verlust der Fruchtbarkeit, Operationsrisiko) wie auch der hormonalen Kastration (häufige Applikation, schlechte Wirksamkeit, Doping, hoher finanzieller Aufwand) stellt die immunologische Kastration eine einfache, wirkungsvolle, tierschonende und reversible Alternative dar.

Die Unterdrückung der Geschlechtsfunktion ist grundsätzlich durch Immunisierung mit verschiedenen Hormonen der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse möglich (D'Occhio, 1993; Thompson, 2000). Da in dieser Hormonkaskade das Gonadotropin-Releasinghormon (GnRH) eine zentrale Rolle einnimmt, wurde schon seit mehreren Jahren versucht, mit anti-GnRH-Vakzinen das männliche Reproduktionsgeschehen zu beeinflussen. GnRH ist ein Neurohormon und besteht bei allen Säugetieren aus 10 Aminosäuren. Damit es im Körper als Antigen wirken kann, muss es vorerst an ein Trägerprotein gekoppelt werden. Die nach Injektion des Haptens gebildeten Antikörper neutralisieren das körpereigene GnRH, was zu einer Hemmung der LH-Sekretion (und in geringerem Ausmass auch von FSH) und folglich auch zu einer geringeren Testosteronproduktion mit entsprechenden Auswirkungen auf Libido und Hodenfunktion führt. Erfolgt die Impfung vor der Pubertät, verbleiben die Gonaden im praepubertären Zustand, während bei einer Immunisierung adulter Tiere Hodengrösse und –funktion nach der Impfung kontinuierlich abnehmen.

Erste Versuche mit verschiedenen GnRH-Vakzinen wurden vor mehr als 25 Jahren bei Tierarten wie Rind (Robertson et al., 1979, 1982), Schaf (Lincoln und Frazer, 1979; Jeffcoate et al., 1982) und Schwein (Falvo et al., 1986; Caraty und Bonneau, 1986) durchgeführt. Neben der Kastration mittels GnRH-Impfung interessierten bei Nutztieren vor allem auch die Auswirkungen auf die Mastleistung (Adams et al., 1996; Cook et al., 2000; D'Occhio et al., 2001) und beim Schwein steht die Unterdrückung des unangenehmen Ebergeruchs an erster Stelle (Bonneau et al., 1994; Dunshea et al., 2001; Jaros et al., 2005). Eine aktive Immunisierung gegen GnRH wurde auch beim Hund (Ladd et al., 1994), der Katze (Levy et al., 2004) und verschiedenen Wildtieren wie zum Beispiel dem Elefanten (Fayer-Hosken et al.,



2001) zur Populationskontrolle untersucht. In der Humanmedizin werden GnRH-Vakzinen nicht nur zur Fertilitätskontrolle sondern auch zur Bekämpfung von Steroid abhängigen Prostataerkrankungen eingesetzt (Simms et al., 2000).

Beim Pferd wurde die Immunisierung gegen GnRH erstmals durch Schanbacher und Pratt (1985) beschrieben, die einen 3-jährigen kryptorchiden Hengst vakzinierten.

Später kamen weitere Untersuchungen (Dowsett et al., 1991, 1996; Malmgren et al., 2001; Clement et al., 2005; Elhay et al., 2007) hinzu, wobei die GnRH-Impfung neben der Wirkung auf das Fortpflanzungsgeschehen auch zur Therapie der Equinen viralen Arteritis (Burger et al., 2004; 2006) eingesetzt wird.

In der Schweiz wurden in den letzten Jahren verschiedene Untersuchungen mit der spezifischen Schweine-Vakzine Improvac<sup>®</sup> (Pfizer, Animal Health) als Alternative zur chirurgischen Kastration beim Eber (Jaros et al., 2005) und Widderlamm (Janett et al., 2003) und zur Zykluskontrolle bei der Stute (Imboden et al., 2006) durchgeführt.

Da seit 2001 in Australien und Neuseeland eine speziell für das Pferd kommerziell hergestellte GnRH-Vakzine (Equity<sup>®</sup>, Pfizer Animal Health, Australia) auf dem Markt erhältlich ist und entsprechende Untersuchungen beim Hengst fehlen, bestand das Ziel der vorliegenden Studie darin, Verträglichkeit, Wirksamkeit und Wirkungsdauer von Equity<sup>®</sup> genauer abzuklären. Insbesondere interessierten uns die Auswirkungen auf den Verlauf von Testosteron und des GnRH-Antikörpertiters im Blut sowie auf das Sexualverhalten, die Hodengrösse und die Samenqualität.

## **4. Tiere, Material und Methoden**

### **4.1. Tiere**

Für die vorliegenden Untersuchungen standen 8 adulte, deckerfahrene Hengste (7 Freiberger und ein Warmblut) im Alter zwischen 6 und 15 Jahren des Nationalgestüts Avenches zur Verfügung. Alle Tiere wurden in Boxen auf Stroh oder Häckseleinstreu gehalten. Die Fütterung bestand aus Heu oder Grassilage, Hafer und einer Kraftfuttermischung. Zudem wurde 1-2 mal wöchentlich Mash (aufgebrühter Hafer, Weizenkleie, Leinsamen, Glaubersalz) verabreicht. Ein Leckstein stand den Tieren immer zur freien Verfügung. Die Hengste wurden regelmässig geritten, gefahren oder im Karussell bewegt und zusätzlich standen ihnen Weidegang oder Auslauf auf dem Sandpaddock zur Verfügung.

### **4.2. Versuchsanordnung**

Vor Versuchsbeginn wurden die extragonadalen Spermienreserven aller Hengste durch tägliche Samenentnahmen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen minimiert und die Tiere ans Phantom gewöhnt (Hurtgen, 1992). Während der ganzen Versuchszeit von 52 Wochen (Mai 2003 bis Mai 2004) wurden die Hengste in wöchentlichen Abständen zur Bestimmung der Samenqualität abgesamt. Von den 8 zur Verfügung stehenden Hengsten wurden 5 Tiere (A bis E) zufällig einer Versuchs- und 3 Tiere (F-H) einer Kontrollgruppe zugeteilt. Nach der Samengewinnung in den Wochen 0, 4 und 12 wurden die Versuchstiere mit je 200µg GnRH-Vakzine (Equity®, Pfizer Animal Health) intramuskulär geimpft, während Kontrolltiere die gleiche Menge NaCl erhielten. Zur Überprüfung der Verträglichkeit wurden bei allen Hengsten unmittelbar vor und während 7 Tagen nach einer Impfung das Allgemeinbefinden beurteilt, die Körpertemperatur gemessen sowie im Bereich der Injektionsstelle Veränderungen wie Schwellungen, Schmerz und Steifheit registriert.

### **4.3. Bestimmung von Testosteron und GnRH-Antikörpertiter**

Jeweils am Morgen vor der wöchentlichen Absamung wurde allen Hengsten aus der Vena jugularis eine Blutprobe entnommen. Das Blut wurde in Lithium S-Monovetten®

(Sarstedt, Sevelen) aufgefangen, sofort zentrifugiert (4000xg, 10 min) und das gewonnene Plasma bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Testosteron wurde mittels Elektrochemilumineszenz Immunoassay (Elecsys 2010, Roche Diagnostics, Basel) bestimmt. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 0.02 ng/ml Plasma. Die Inter- und Intraassaykoeffizienten betrugen 2,2 % bzw. 1,4%. Antikörpertiter gegen GnRH wurden durch einen Radio-Liganden-Bindungsassay nach Finnerty (1994) bestimmt. Die Ergebnisse werden als prozentuale Bindung von GnRH des total mit Jod-125 markierten GnRHs bei einer Verdünnung von 1:40 dargestellt.

#### **4.4. Samengewinnung**

Die Samengewinnung erfolgte am Phantom mittels künstlicher Scheide (Modell Avenches, Scheidentemperatur 38°C) mit integriertem Filter (Milchfilterschläuche für Rohrmelkanlagen aus Vliesstoff, 250 x 57 mm (Flawa, Flawil) in Anwesenheit einer ovariectomierten Stute. Ein Hengst (G) aus der Kontrollgruppe konnte nur mit einer rossigen Stute abgesamt werden, da er das Phantom verweigerte.

#### **4.5. Untersuchungen im Frischsamen**

Das gefilterte, unverdünnte Ejakulat wurde unmittelbar nach der Gewinnung zur Beurteilung der Qualität des Frischsamens in ein Wasserbad bei 37° C gestellt.

##### **4.5.1. Volumen**

Nach Filtration des Ejakulates wurde das Volumen in einem graduierten Messzylinder bestimmt

##### **4.5.2. Dichte**

Die Spermienkonzentration des Frischsamens wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers (Spermacue®, Minitüb, Landshut, Deutschland) gemessen.

##### **4.5.3. Gesamtspermienzahl**

Die Gesamtspermienzahl (Ausbeute) stellt die absolute Anzahl Spermien im Ejakulat dar und ergibt sich aus dem Produkt von Volumen und Dichte.

#### 4.5.4. Spermienmotilität

Nach der Dichtebestimmung wurde der Samen auf eine Konzentration von 30 Millionen Spermien/ml verdünnt (INRA 96, IMV, Aîgle, France). Die objektive Bestimmung der Motilität erfolgte mittels Computer-assistierter Spermien-Analyse (HTM-IVOS, Version 12, Beverly, MA, USA). Für die Messungen wurden die Analyse-Einstellungen (settings) für Hengstesperma von Dr. Dickson Varner, Texas A&M University, übernommen (Tab. 1). Dazu wurden 5 µl des verdünnten Samens in vorgewärmte 20 µm tiefe Messkammern (Standard Count Analysis Chambers SC 20-01-C, Leja, Nieuw-Vennep, Niederlande) gegeben, mindestens 10 verschiedene Messfelder und mindestens 500 Spermien beurteilt. Für die Auswertung wurden die Parameter Motilität total (motility) und progressive Motilität (progressive) verwendet.

Tabelle 1: Einstellungen (settings) des CASA für Hengstsaamen.

Parameter	Settings	Parameter	Settings
Frames per second	60	Min. intensity gate	0.25
Number of frames	30	Max. intensity gate	2.1
Minimum contrast	115	Min. size gate	0.70
Minimum size	2	Max. size gate	3.60
Default cell size	6	Min. elongation gate	0
Default cell intensity	125	Max elongation gate	100
VAP	50	Standard objective	10x
STR	50	Target photometer	50
Slow cells	Static	Field type	Dark
VAP cut off	5	Chamber depth	20
VSL cut off	15	Temperature	37°C

#### 4.5.5. Spermienmorphologie

Für die morphologische Spermienuntersuchung wurden 2 Tropfen Frischsamen in 2 ml Hancock Lösung (s. Appendix) fixiert. Davon wurden einige Tropfen auf einen Objektträger pipettiert und anschliessend zum Trocknen senkrecht auf ein Löschblatt gestellt. Die getrockneten Ausstriche wurden während 10 Minuten unter fliessendem Wasser gewaschen und anschliessend an der Luft getrocknet. Zur morphologischen Beurteilung wurden die so erhaltenen Ausstriche mit einem kleinen Tropfen Wasser

sowie einem Deckglas (24 x 24 mm) versehen und mindestens 200 Spermien bei 1000-facher Vergrösserung im Phasenkontrast-Mikroskop (Olympus BX50, U Plan FI 100x/1.30) ausgezählt. Die Protokollierung der Spermienanomalien erfolgte gemäss Klassifikationsschema des andrologischen Labors der Klinik für Fortpflanzungsmedizin (s. Appendix), wobei der Prozentsatz an normalen Spermien und solchen mit Hauptdefekten (Akrosomdefekte, Kernvakuolen, abnormale Köpfe, Proximaltropfen, Mittelstückdefekte) berechnet wurde.

#### **4.6. Skrotalweite**

Nach dem Absamen wurde bei allen Hengsten mittels eines Lochzirkels (scrotal calliper) wöchentlich die Skrotalweite gemessen.

#### **4.7. Verhalten und Libido**

Mittels Stoppuhr wurden die Zeiten ermittelt, die der Hengst vom Betreten der Absamungshalle bis zu einer deutlichen Erektion sowie bis zum 1. Sprung aufs Phantom und bis zur Ejakulation benötigte. Falls ein Hengst 10 Minuten nach Betreten der Absamungshalle keine Erektion zeigte oder keine Ejakulation möglich war, wurde der Versuch abgebrochen.

#### **4.8. Wirkungseintritt und Reversibilität**

Nach der Impfung mit Equity<sup>®</sup> kommt es in der Regel zu einer Hemmung der Hodenfunktion bzw. der Testosteronsekretion. Als Beginn der Impfwirkung wurde der Zeitpunkt bezeichnet, ab dem in zwei aufeinanderfolgenden Wochen ein Testosteronwert von weniger als 0.1 ng/ml gemessen werden konnte. Der Impfeffekt wurde als reversibel bezeichnet, wenn erstmals wieder folgende Kriterien gleichzeitig erfüllt wurden:

- Plasmatestosteronkonzentration in zwei aufeinanderfolgenden Wochen grösser als 0.1 ng/ml
- Ejakulation innerhalb von 10 Minuten nach Betreten der Absamungshalle
- Mindestens 500 Millionen motile Spermien im Ejakulat

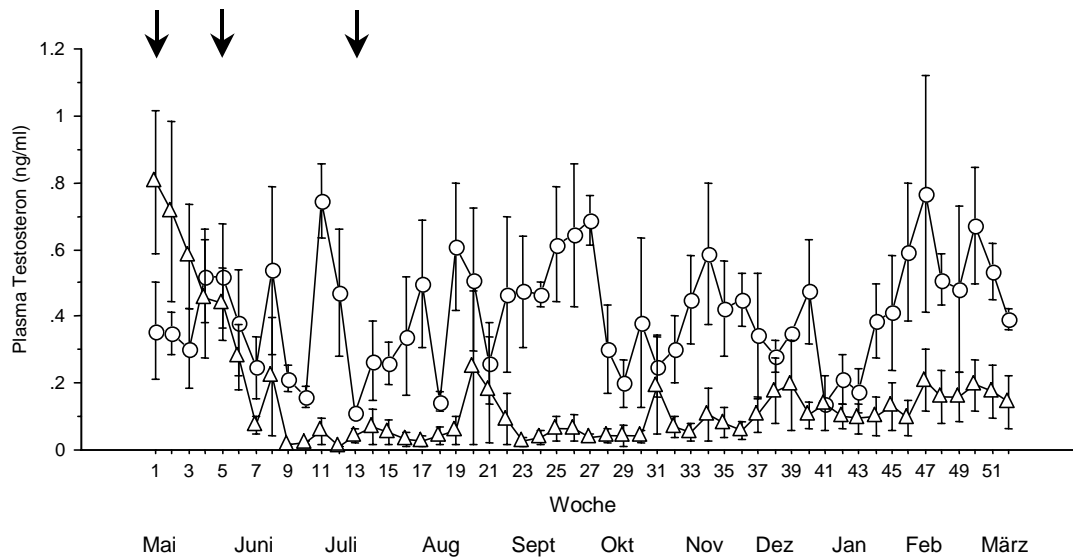
## 5. Ergebnisse

### 5.1. Verträglichkeit der Impfung

Keiner der insgesamt 5 vakzinierten Hengste zeigte nach der Impfung mit 1 ml Equity® eine Störung des Allgemeinbefindens oder eine erhöhte Körpertemperatur. Ein Tier (B) reagierte jeweils nach der 1. und 3. Impfung während 2 Tagen mit einer geringgradigen Hautschwellung ohne Druckdolenz an der Injektionsstelle und bei einem weiteren Tier (D) war eine vorübergehend lokale, schmerzhaft Schwellung nach der 3. Impfung festzustellen.

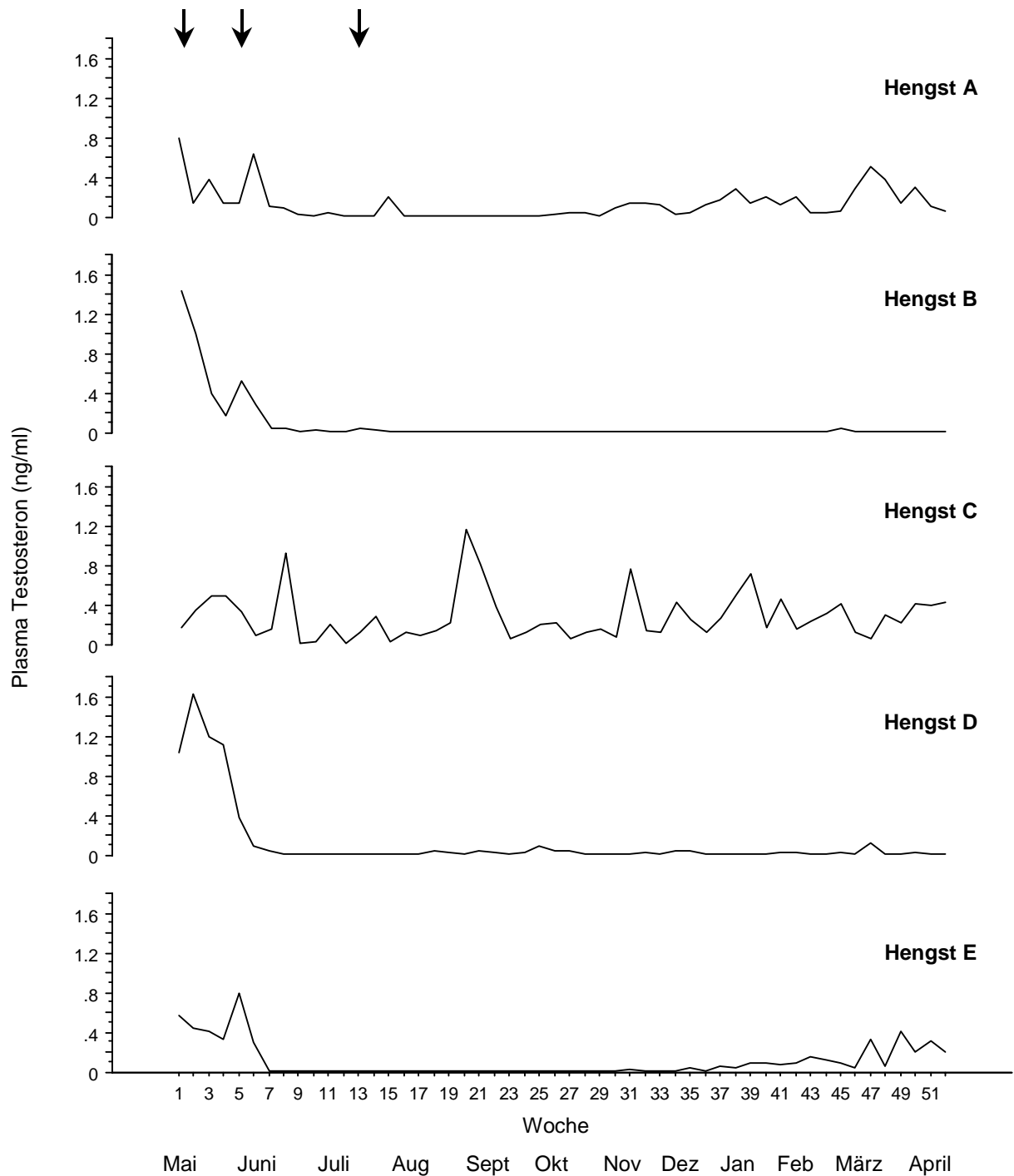
### 5.2. Testosteron

Die durchschnittlichen Testosteronkonzentrationen der geimpften und nicht geimpften Hengste während der ganzen Versuchsdauer sind in Abbildung 1 dargestellt. Nach der 2. Impfung mit Equity® sind die Testosteronwerte innerhalb von 2 Wochen von ursprünglich 0.8 ng/ml Plasma auf weniger als 0.1 ng/ml abgefallen. Die vorübergehenden Erhöhungen in den Wochen 20-22, sowie 30-32 und 37-40 lassen sich auf die hohen individuellen Schwankungen von Hengst C (Abb. 2) zurückführen. Erst ab Woche 46 stiegen die Durchschnittswerte leicht an und bewegten sich bis Versuchsende zwischen 0.1 und 0.2 ng/ml Plasma. Im Vergleich zu den vakzinierten Tieren zeigten die Kontrolltiere eine episodische Testosteronsekretion mit erheblichen Schwankungen zwischen 0.1 und 0.8 ng/ml Plasma.



**Abbildung 1:** Verlauf der durchschnittlichen ( $m \pm \text{SEM}$ ) Testosteronkonzentrationen im peripheren Blut bei fünf geimpften Hengsten ( $\Delta$ ) und 3 Kontrolltieren (O). Pfeile stellen die Applikation von Equity<sup>®</sup> bzw. phys. NaCl-Lösung dar.

Die individuelle Wirkung der Impfung bezüglich Testosteronverlauf aller 5 Hengste ist in Abbildung 2 dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass Hengst C auch nach dreimaliger Impfung nur ungenügend reagierte, da die Testosteronschwankungen während des ganzen Versuchs deutlich grösser ( $< 0.1\text{--}1.2$  ng/ml Plasma) waren, als bei den übrigen 4 Tieren ( $< 0.1\text{--}0.5$  ng/ml Plasma). Bezüglich Wirkungsdauer zeigten die beiden Hengste B und D bis zum Ende des Versuchs niedrigere Testosteronwerte unterhalb  $0.1$  ng/ml Plasma, während dies bei den Hengsten A und E nur bis Woche 31 bzw. 42 der Fall war und bei Hengst C eine zuverlässige Hemmung von Testosteron ganz ausblieb.

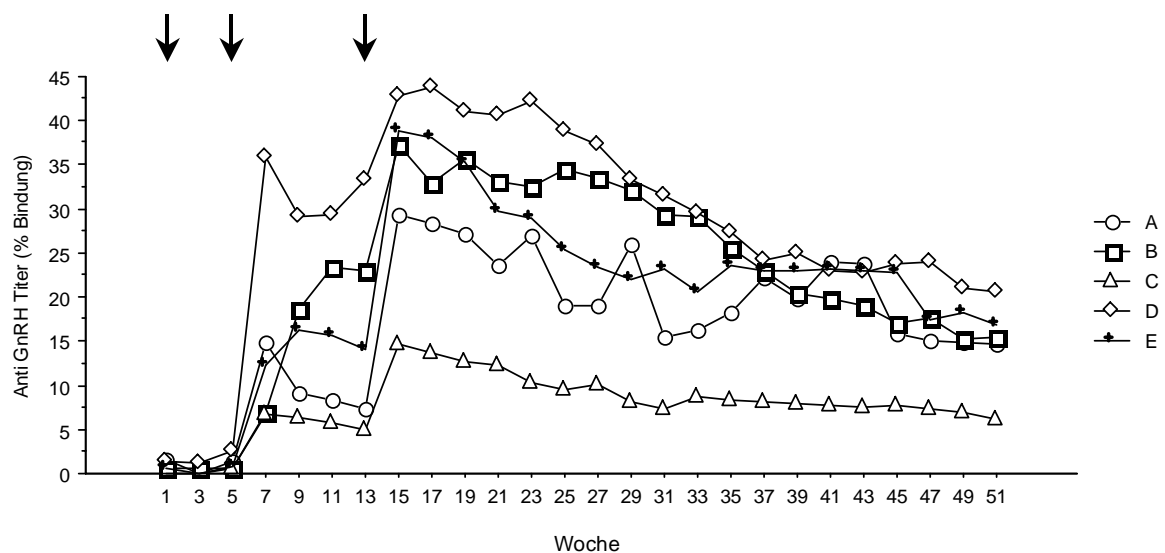


**Abbildung 2:** Verlauf der Testosteronkonzentrationen im peripheren Blut bei fünf geimpften Hengsten. Pfeile stellen die Applikation von Equity<sup>®</sup> dar.



### 5.3. GnRH-Antikörpertiter

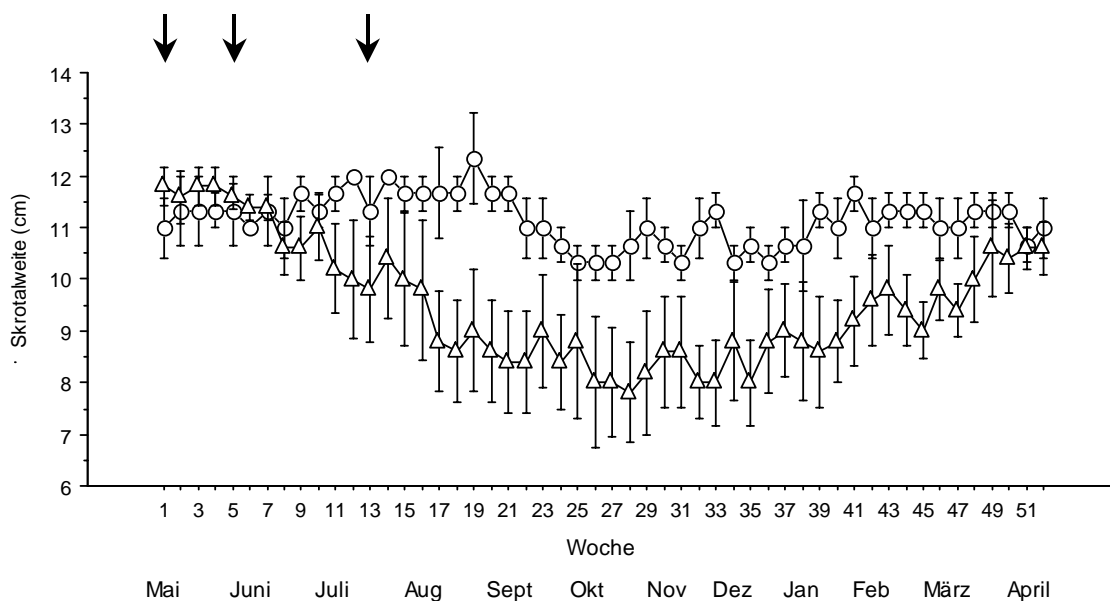
Der Verlauf der einzelnen GnRH-Antikörpertiter bei allen 5 geimpften Hengsten während der Versuchsdauer ist in Abbildung 3 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die anti-GnRH Titer unmittelbar nach der 2. Impfung individuell unterschiedlich stark angestiegen sind und nach der 3. Impfung maximale Werte zwischen 14.6% und 43.9% Bindung erreichten. Anschliessend fielen die Titer kontinuierlich ab und pendelten sich in der Woche 51 zwischen 6.9 und 21.0 % Bindung ein. Die deutlich geringste Reaktion bezüglich Antikörperbildung war bei Hengst C vorhanden.



**Abbildung 3:** Verlauf der GnRH-Antikörpertiter bei fünf geimpften Hengsten (% Bindung bei 1:40 Plasmaverdünnung). Pfeile stellen die Applikation von Equity® dar.

#### 5.4. Skrotalweite

Die durchschnittlichen Werte des Skrotalweite bei geimpften und nicht geimpften Hengsten während der ganzen Versuchsdauer sind in Abbildung 4 aufgezeichnet. Rund 5 Wochen nach der 2. Impfung mit Equity® begann die Skrotalweite von rund 11.5 cm bei den geimpften Tieren abzunehmen und erreichte in den Wochen 26 bis 35 die tiefsten Werte mit Schwankungen zwischen 8 und 9 cm. Anschliessend ist eine kontinuierliche Zunahme zu beobachten und am Ende des Versuchs (Wochen 51 und 52) war die durchschnittliche Skrotalweite zwischen den beiden Gruppen nicht mehr zu unterscheiden. Eine vorübergehende Abnahme der Skrotalweite in der Grössenordnung von rund 1.5 cm war auch bei den Kontrolltieren zwischen den Wochen 21 und 39 (Monate Oktober bis Januar) festzustellen.



**Abbildung 4:** Verlauf der durchschnittlichen ( $m \pm \text{SEM}$ ) Skrotalweite bei fünf geimpften Hengsten ( $\Delta$ ) und 3 Kontrolltieren (O). Pfeile stellen die Applikation von Equity® bzw. phys. NaCl-Lösung dar.

## **5.5. Samenqualität**

Mit Ausnahme von Hengst D, der während der ganzen Versuchszeit von 52 Wochen ohne Probleme abgesamt werden konnte, war dies bei den übrigen geimpften Tieren, insbesondere bei den Hengsten B, C und E während der zweiten Hälfte des Versuchs (Oktober bis Februar) nicht immer der Fall. In der Kontrollgruppe war die Samengewinnung bei allen Tieren zu jeder Zeit möglich. Aufgrund der teilweise fehlenden Ejakulate bei geimpften Tieren, ersichtlich an den Lücken bei der Darstellung der verschiedenen Samenqualitätsparameter (Abbildungen 5-12), kamen Mittelwertsvergleiche zwischen beiden Gruppen nicht in Frage.

### **5.5.1. Volumen**

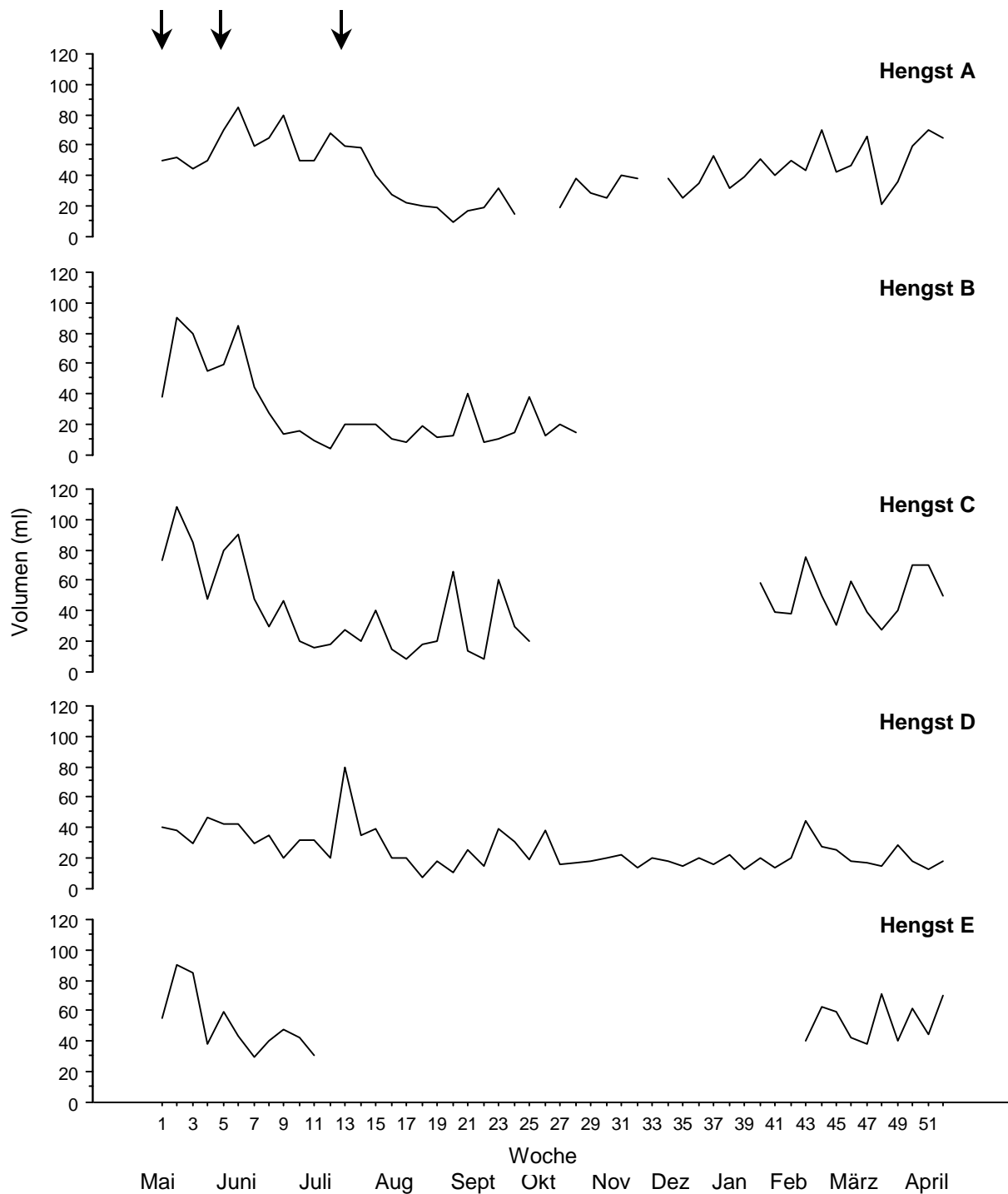
Das Ejakulatvolumen aller geimpften Hengste schwankte zwischen 4 und 108 ml und dasjenige der Kontrolltiere zwischen 6 und 95 ml. Beim Vergleich der einzelnen Verläufe in Abbildung 5a fällt auf, dass die anfänglich hohen Volumina von mehr als 80 ml bei den Hengsten A, B, C und E nach der 2. bzw. 3. Impfung mit Equity® deutlich abnahmen und in den Sommermonaten Juli bis September auf einem tiefen Niveau von rund 20 ml schwankten (Werte bei Hengst E nicht vorhanden). Eine nur geringe Abnahme des Ejakulatvolumens nach der Impfung war bei Hengst D zu beobachten. Eine erneute Zunahme des Volumens gegen Ende des Versuchs war bei den Hengsten A und C zu erkennen. Im Gegensatz dazu schwankte die Ejakulatmenge bei allen drei Kontrolltieren (Abb. 5b) auf einem individuell unterschiedlichen aber mehr oder weniger gleich bleibendem Niveau. Erst gegen Versuchsende (ab Woche 42) trat bei den Hengsten F und G, ähnlich wie bei den geimpften Tieren A und C eine Zunahme des Volumens ein.

### **5.5.2. Dichte**

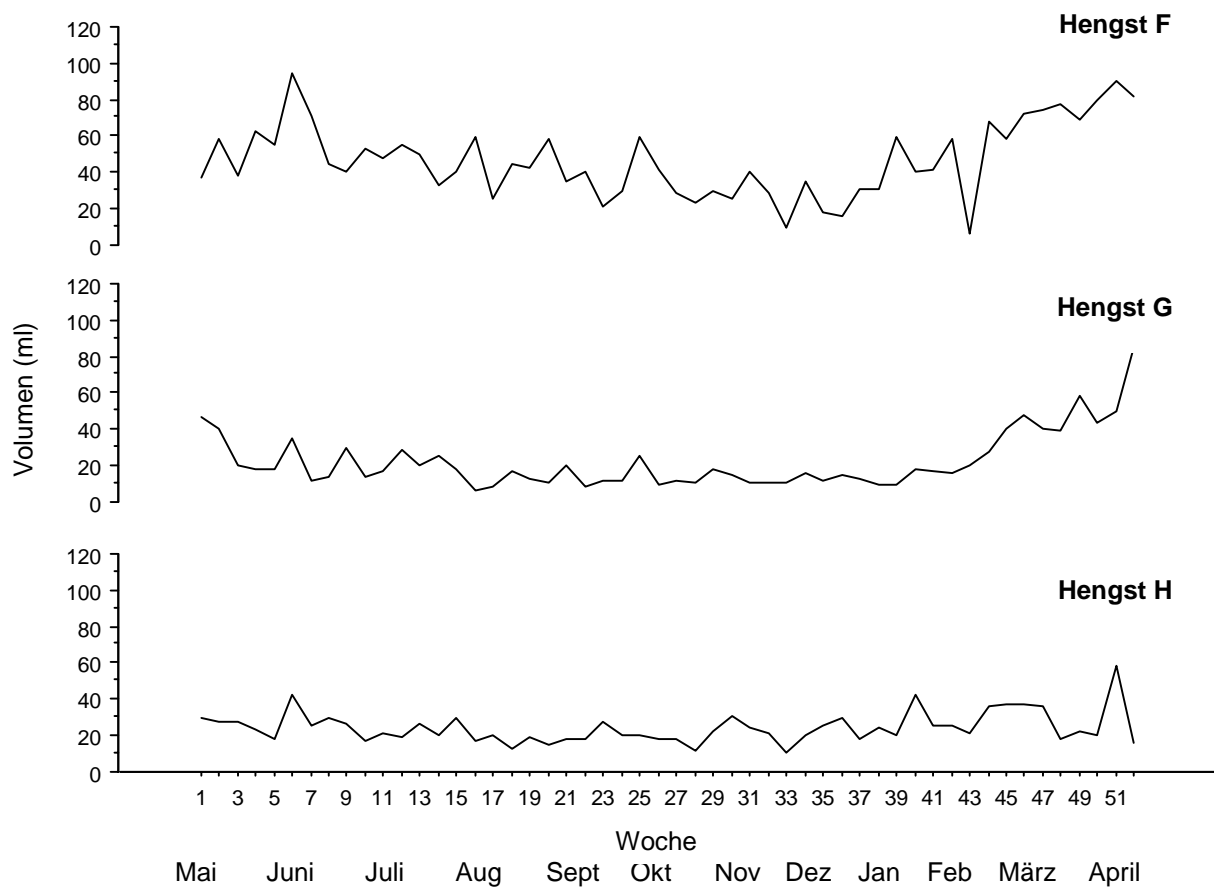
Die Ejakulatdichte aller geimpften Hengste schwankte zwischen 51 und 523 Millionen Samenzellen pro ml und diejenige der Kontrolltiere zwischen 59-570 Millionen/ml. Beim Vergleich der einzelnen Verläufe in den Abbildungen 6a und 6b fallen die individuell unterschiedlichen Schwankungen auf, doch lassen sich keine im Zusammenhang mit der Equity®-Impfung stehenden Veränderungen erkennen.

### **5.5.3. Gesamtspermienzahl**

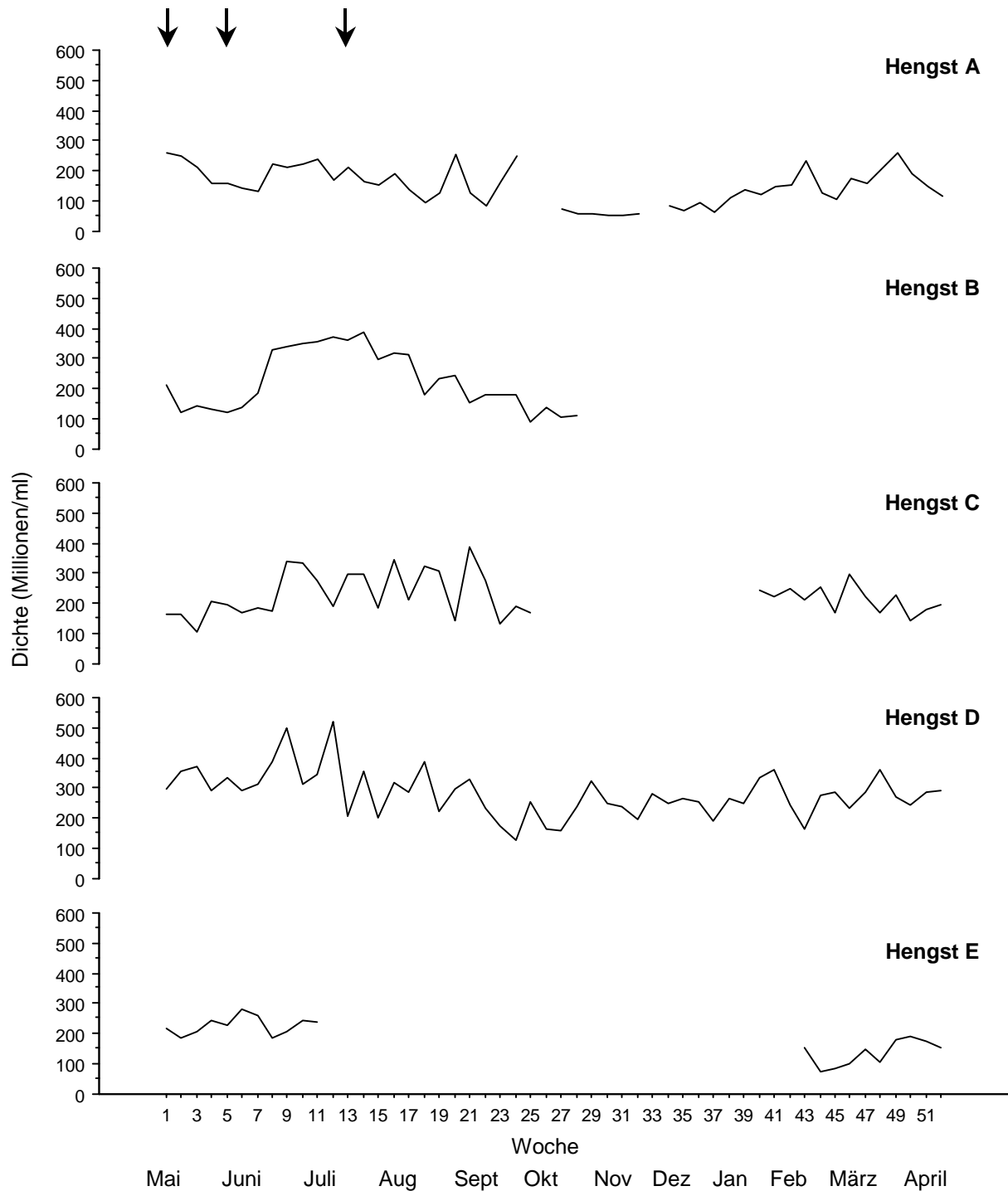
Die Gesamtspermienzahl ergibt sich aus dem Produkt von Volumen und Dichte und schwankte bei den geimpften Hengsten zwischen 2 und 18 Milliarden und bei den Kontrolltieren zwischen 2 und 17 Milliarden. Ähnlich wie beim Ejakulatvolumen zeigen auch die einzelnen Verläufe in Abbildung 7a, dass die Gesamtspermienzahl bei allen geimpften Tieren nach der 1. bzw. 2. Equity<sup>®</sup>-Impfung deutlich abgenommen hat. Dieser Effekt war bei den Kontrolltieren (Abb. 7b) nicht zu beobachten.



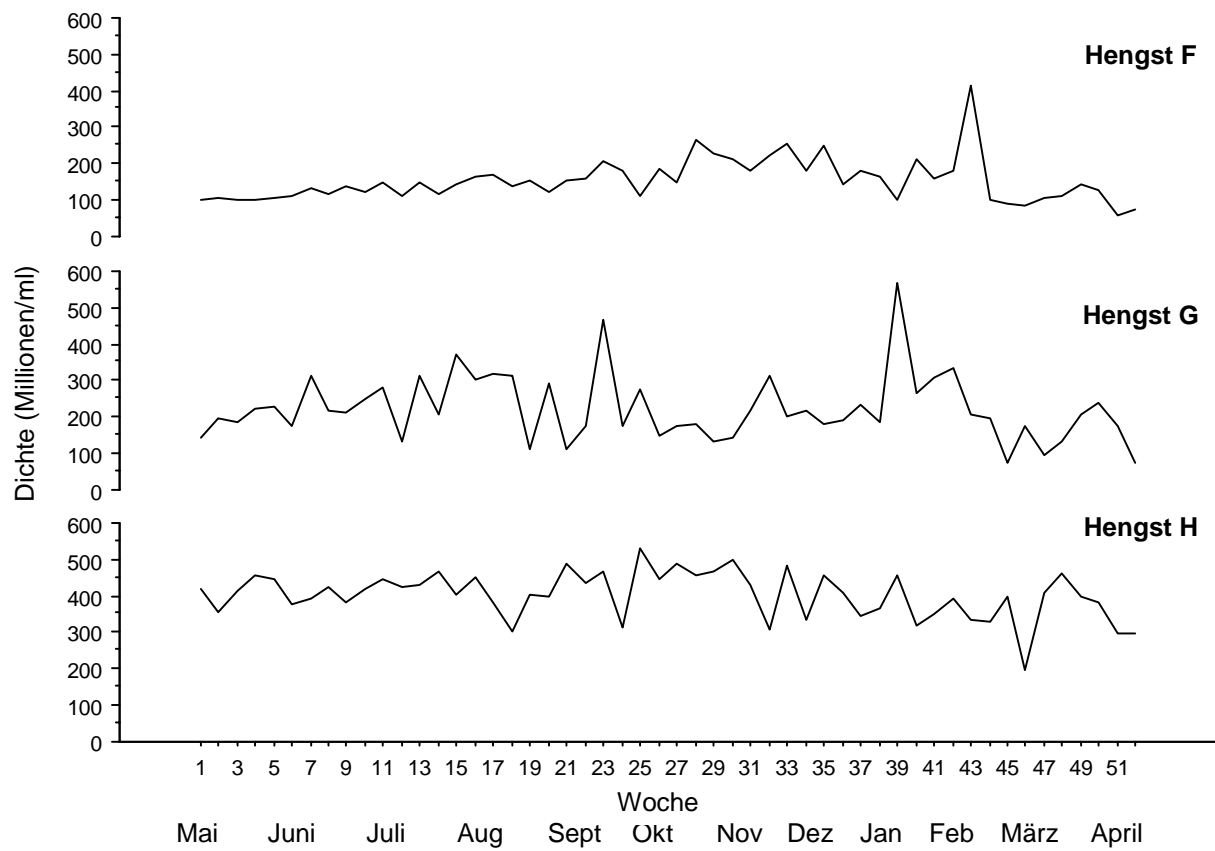
**Abbildung 5a:** Verlauf des Ejakulatvolumens bei fünf geimpften Hengsten. Pfeile stellen die Applikation von Equi® dar.



**Abbildung 5b:** Verlauf des Ejakulatvolumens bei drei Kontrolltieren.

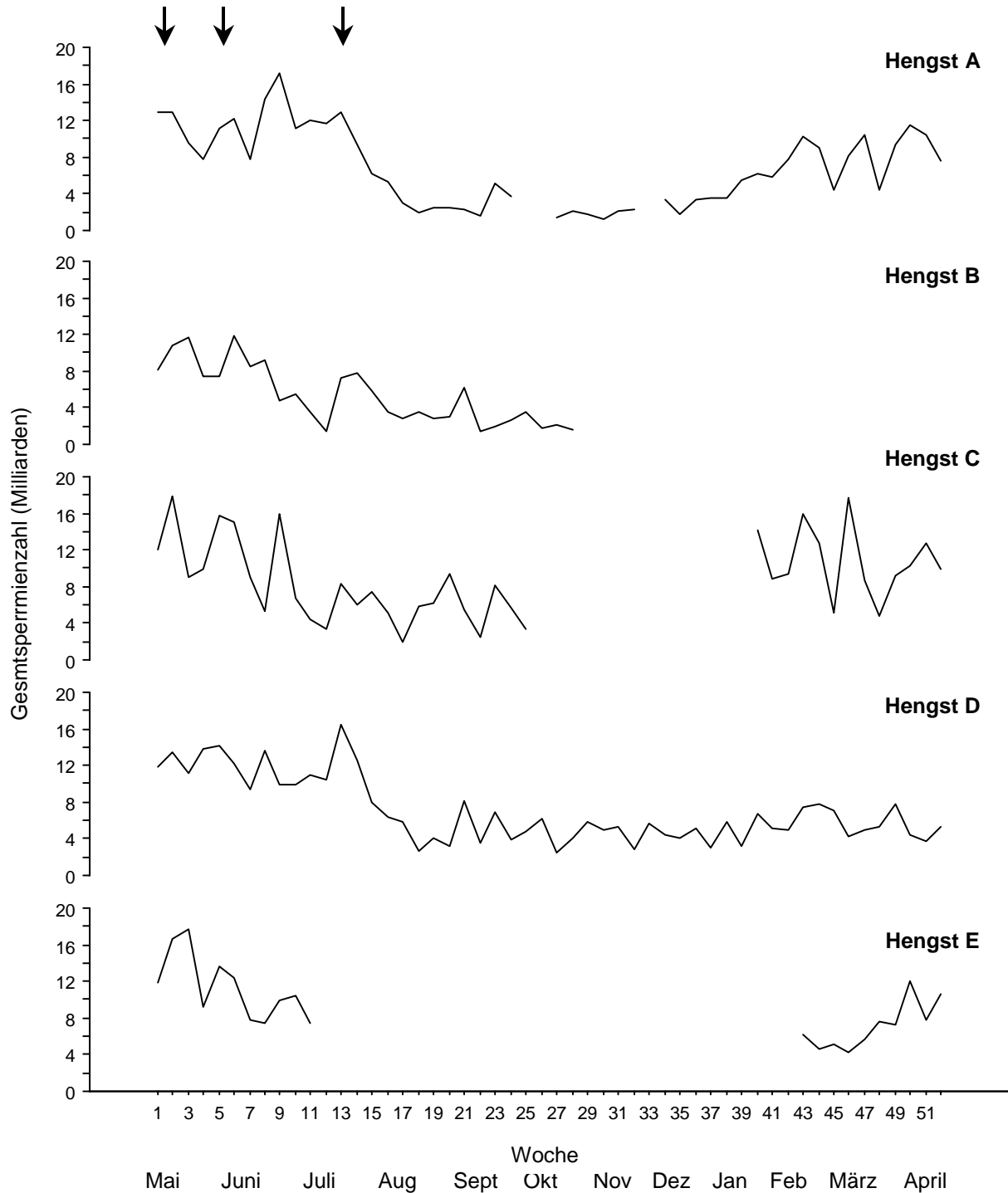


**Abbildung 6a:** Verlauf der Spermiedichte bei fünf geimpften Hengsten. Pfeile stellen die Applikation von Equi<sup>®</sup> dar.

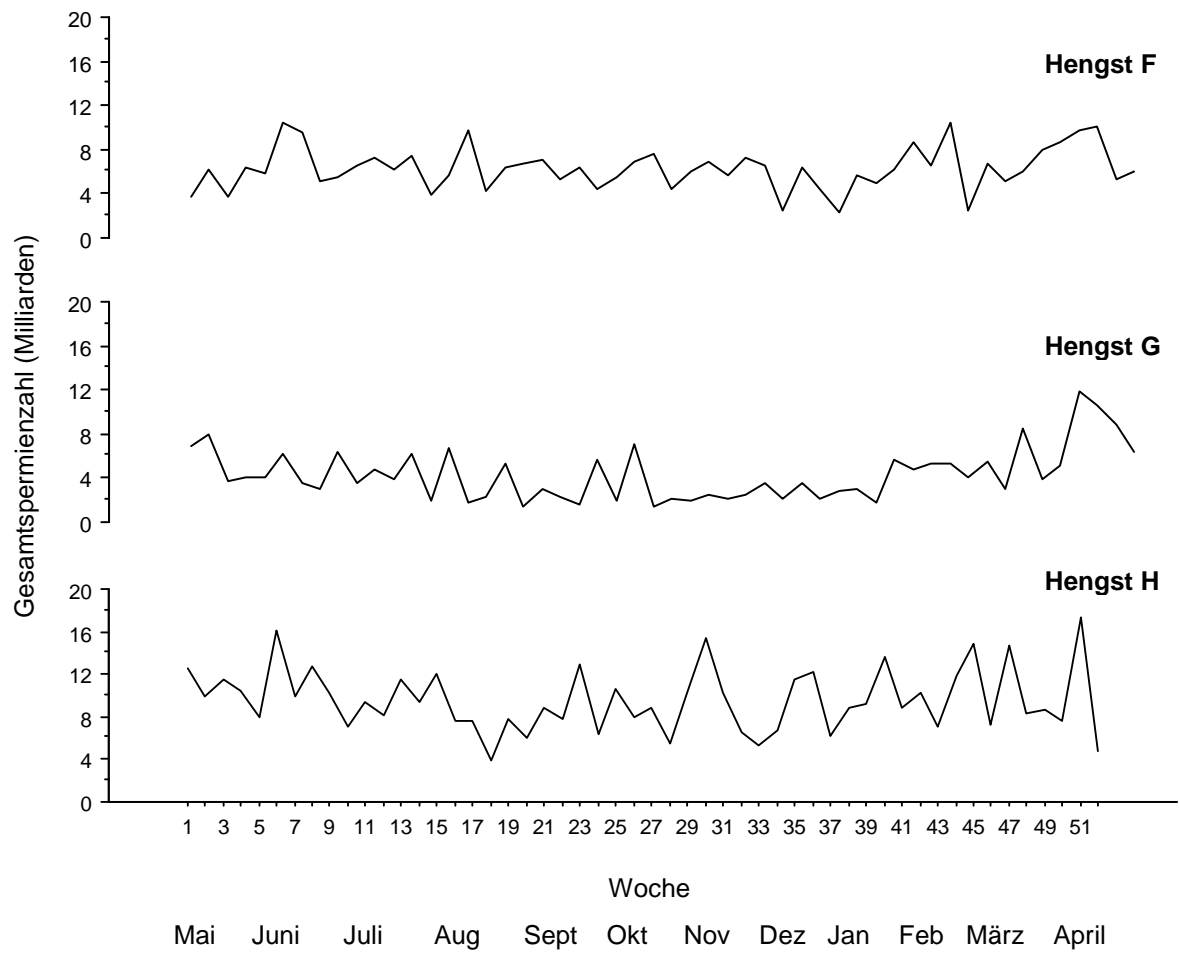


**Abbildung 6b:** Verlauf der Spermiendichte bei drei Kontrolltieren.





**Abbildung 7a:** Verlauf der Gesamtspermienzahl bei fünf geimpften Hengsten. Pfeile stellen die Applikation von Equity® dar.



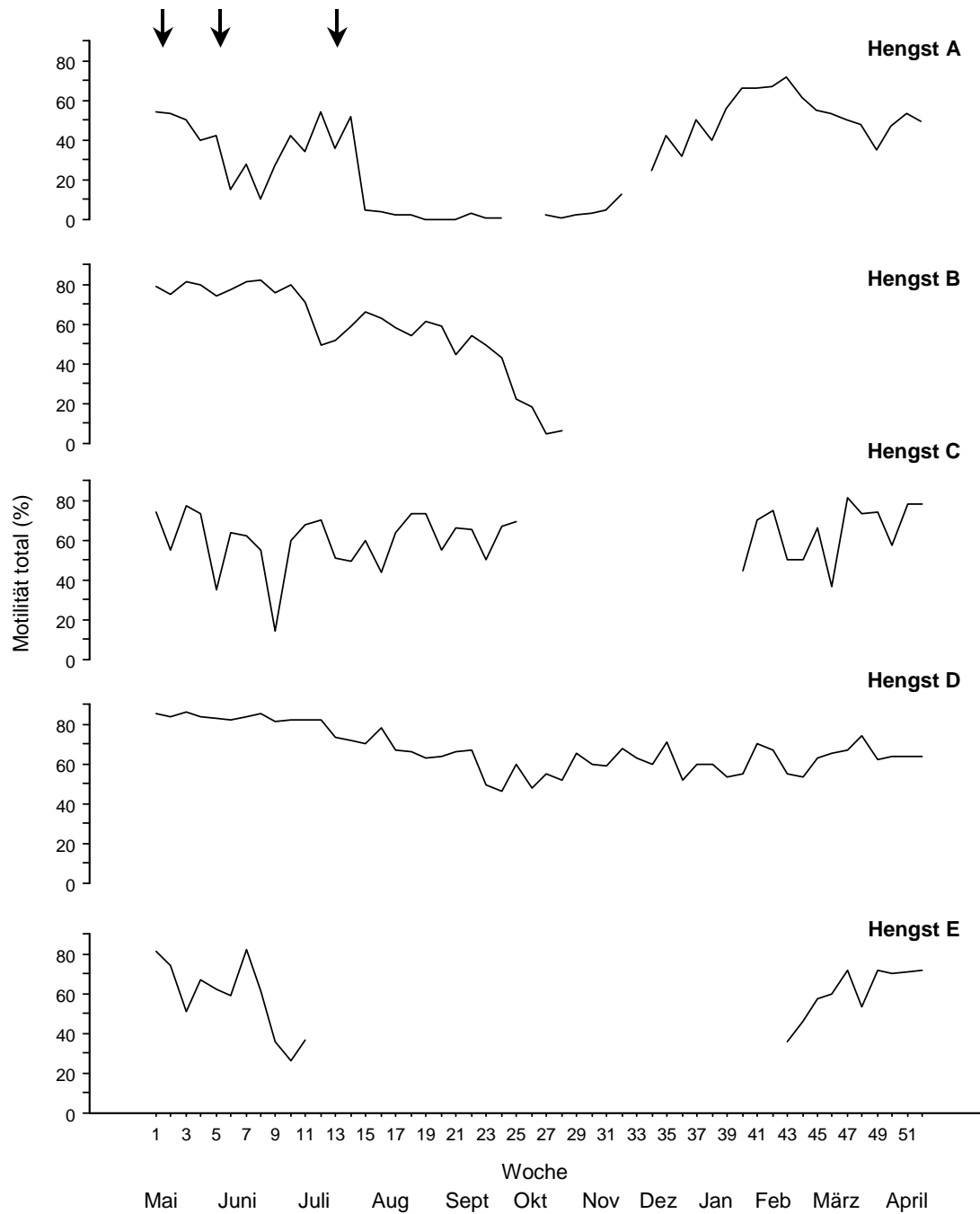
**Abbildung 7b:** Verlauf der Gesamtspermienzahl bei drei Kontrolltieren.

#### **5.5.4. Totale Motilität**

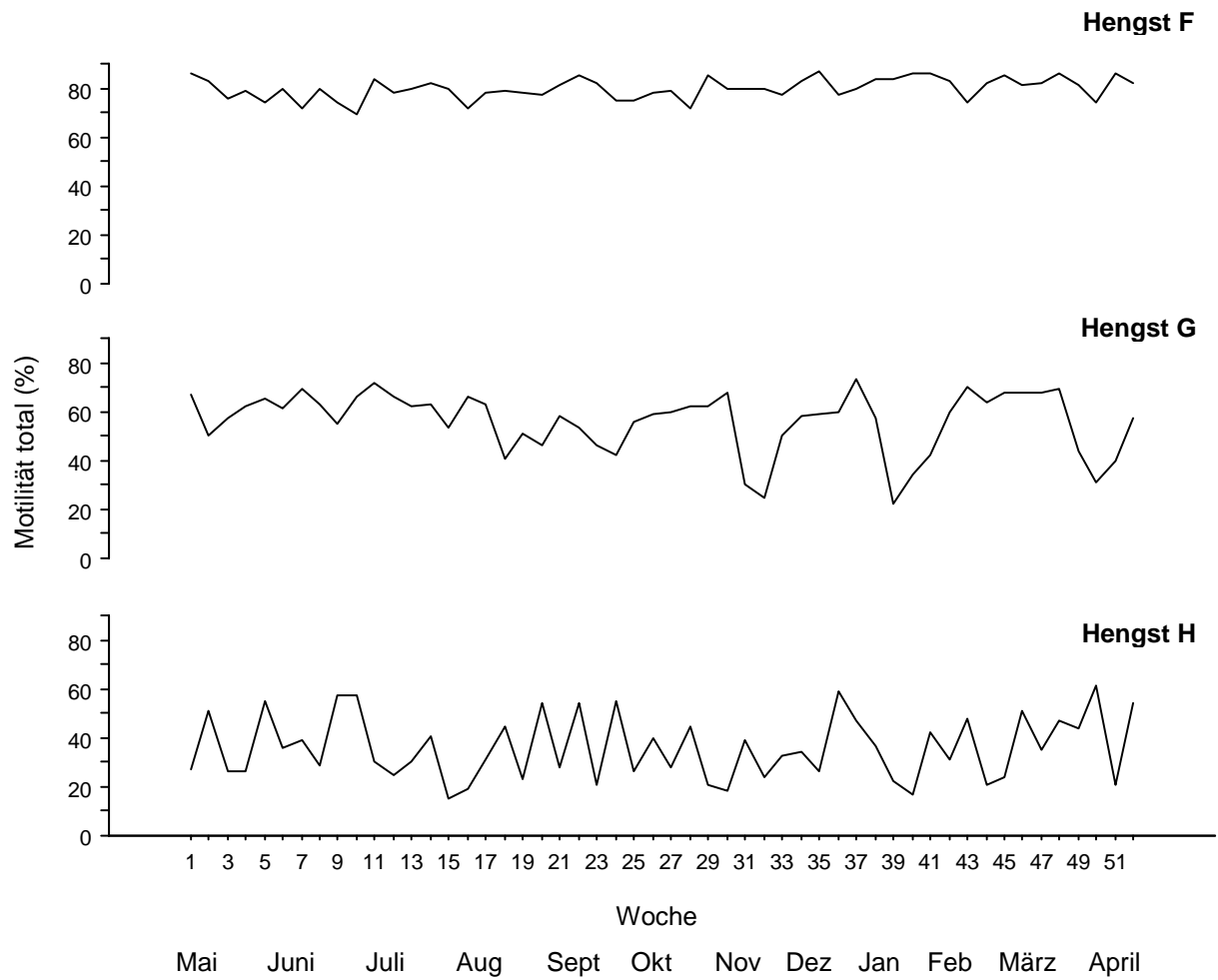
In Abbildung 8a sind die Verläufe der totalen Motilität von Samenzellen aller geimpften Hengste dargestellt. Mit Ausnahme von Hengst C zeigten alle Tiere nach der 2. bzw. 3. Impfung eine individuell unterschiedliche Abnahme der totalen Motilität von maximalen Werten über 90% auf solche von maximal 40%, die sich aber gegen Ende des Versuchs (ab ca. Woche 40) wieder auf die Ausgangswerte vor der Impfung erholten. Im Vergleich dazu schwankte die totale Motilität von Samenzellen der drei Kontrolltiere auf individuell unterschiedlichem aber konstantem Niveau (Abb. 8b) während des ganzen Versuchs.

#### **5.5.5. Progressive Motilität**

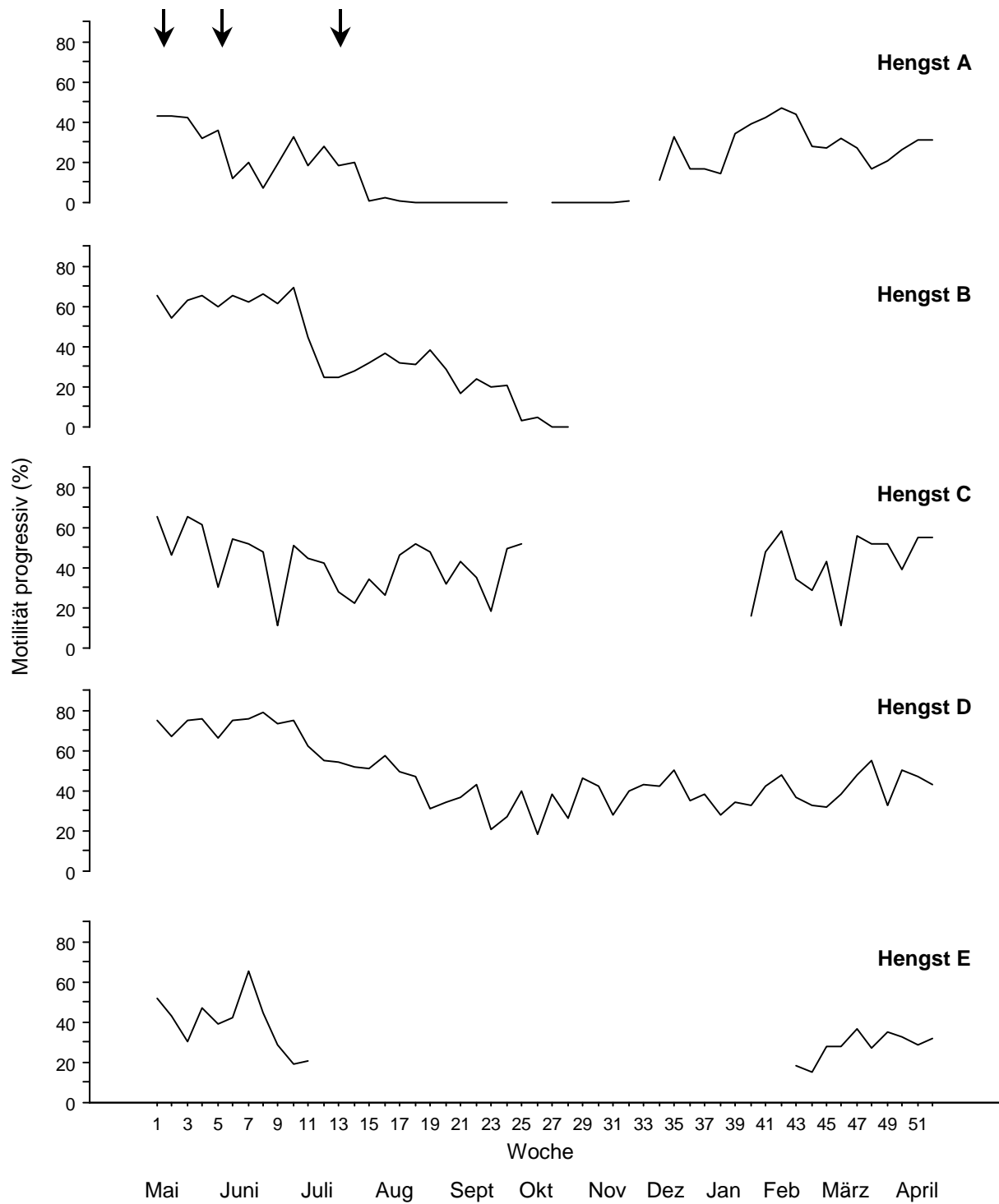
Die Verläufe der progressiven Motilität von Samenzellen bei geimpften Hengsten und Kontrolltieren sind in Abbildungen 9a und 9b dargestellt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der totalen Motilität bewirkten die 2. und 3. Impfung mit Equity® ebenfalls eine individuell unterschiedliche Abnahme der progressiven Motilität von ursprünglich 40-70% auf rund 5-40%. Gegen Versuchsende war ebenfalls ein Anstieg auf Ausgangswerte zu beobachten. Gleich wie die totale Motilität von Samenzellen schwankte auch die progressive Motilität bei den drei Kontrolltieren auf sehr unterschiedlichem Niveau, wobei Hengst F die besten (40-80%) und Hengst H die schlechtesten (5-40%) Werte zeigten.



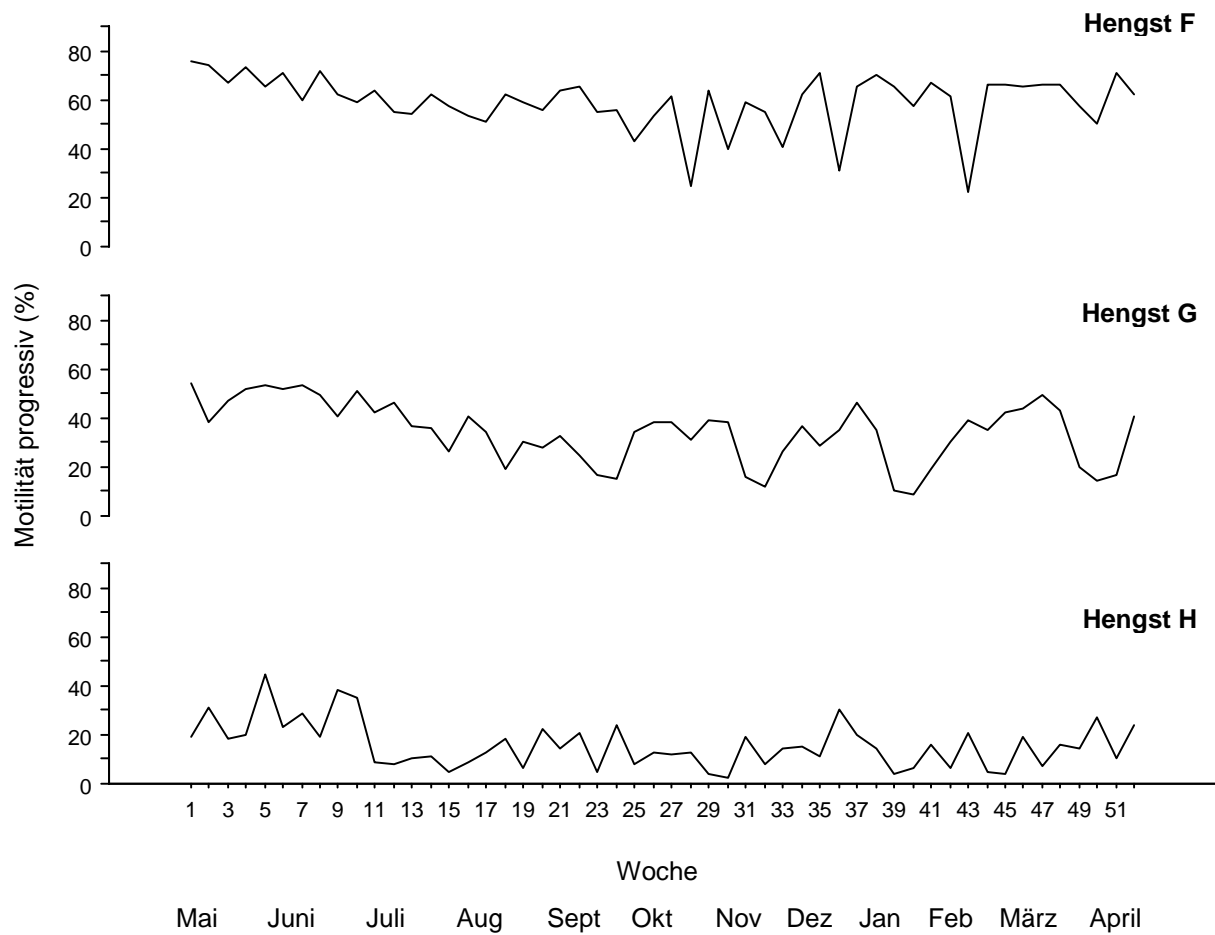
**Abbildung 8a:** Verlauf der totalen Motilität von Samenzellen bei fünf geimpften Hengsten. Pfeile stellen die Applikation von Equity® dar.



**Abbildung 8b:** Verlauf der totalen Motilität von Samenzellen bei drei Kontrolltieren.



**Abbildung 9a:** Verlauf der progressiven Motilität von Samenzellen bei fünf geimpften Hengsten. Pfeile stellen die Applikation von Equi<sup>®</sup> dar.



**Abbildung 9b:** Verlauf der progressiven Motilität von Samenzellen bei drei Kontrolltieren.

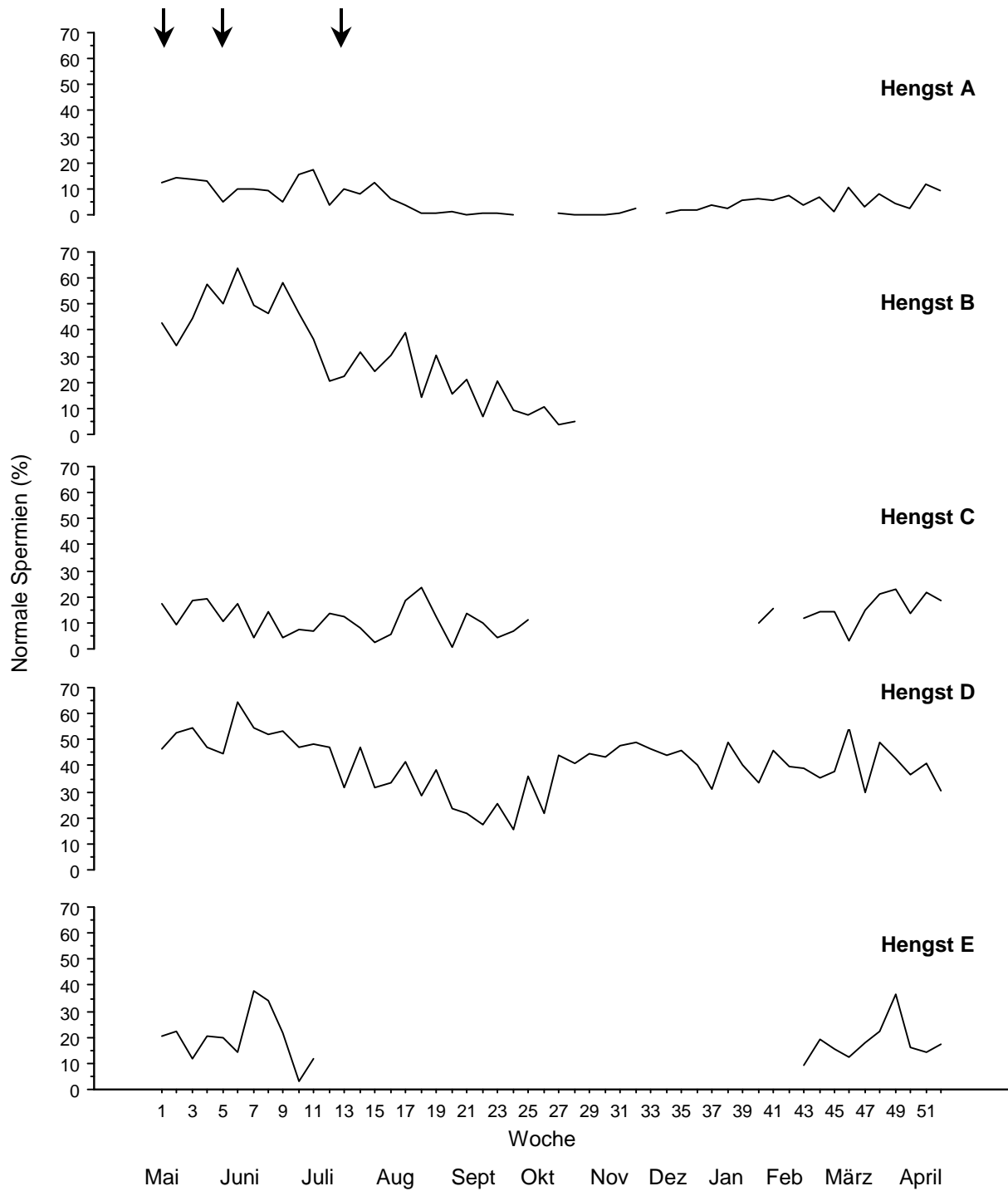
### **5.5.6. Normale Spermien**

Die Verläufe des prozentualen Anteils morphologisch normaler Samenzellen bei den geimpften Hengsten sind in Abbildung 10a dargestellt. Die Ergebnisse lassen klare individuellen Unterschiede erkennen, wobei der Anteil normaler Spermien bei den Hengsten A, C und E mit Schwankungen unterhalb 30% deutlich geringer ist als bei den Hengsten B und D mit Höchstwerten von mehr als 60%. Eine erkennbare Abnahme des Anteils normaler Spermien nach der 2. bzw. 3. Equity®-Impfung ist nur bei letzteren beiden Hengsten zu sehen. Bei den Kontrolltieren in Abbildung 10b ist ebenfalls auffallend, dass der Anteil morphologisch normaler Spermien bei den Hengsten F und H während des ganzen Versuchs auf einem deutlich tieferen Niveau (10-20%) schwankte als bei Hengst G (10-40%).

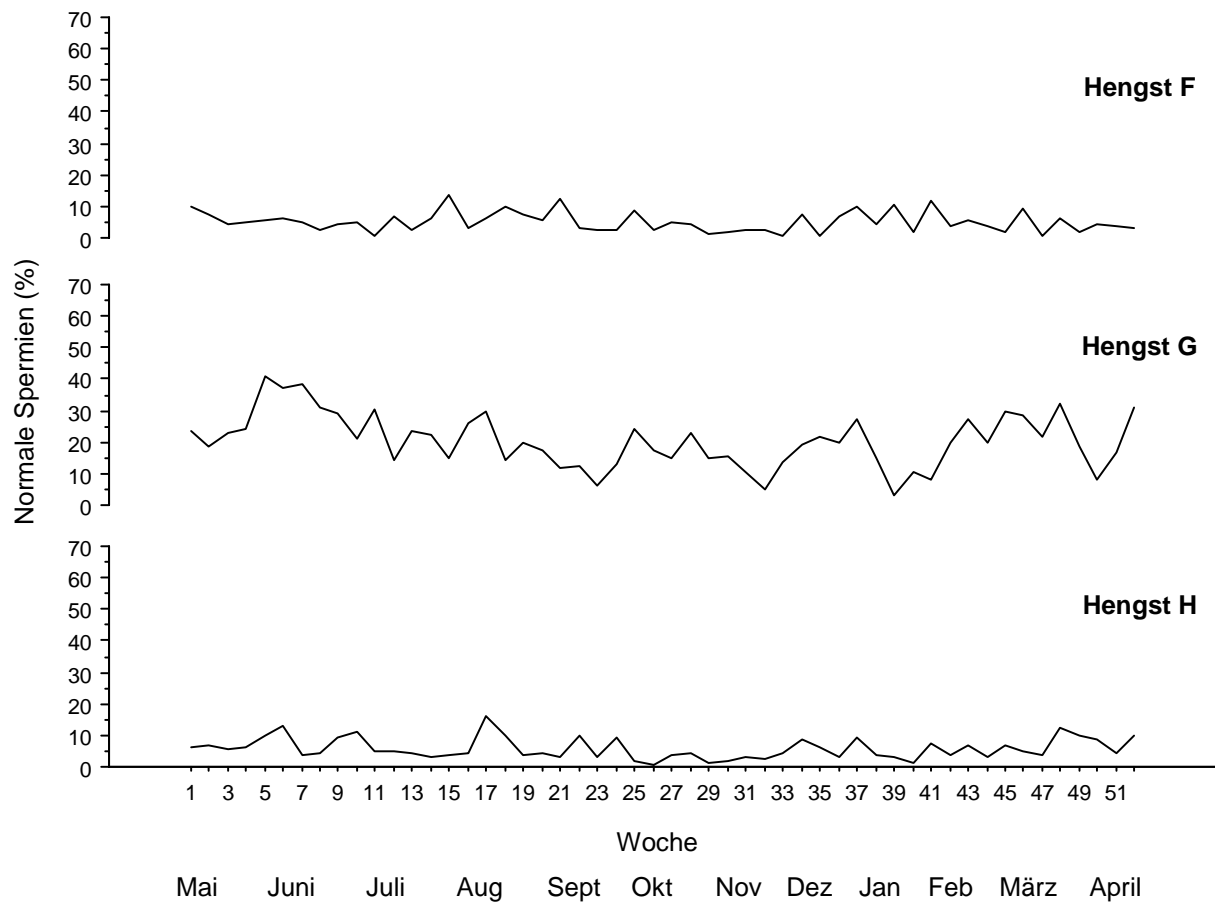
### **5.5.7. Spermien mit Hauptdefekten**

Die Verläufe des prozentualen Anteils an Hauptdefekten von Samenzellen bei den geimpften Hengsten sind in Abbildung 11a dargestellt. Parallel zur Abnahme normaler Samenzellen nach der Impfung zeigten besonders die Hengste B und C aber auch Hengst A eine entsprechende Zunahme der Hauptdefekte. Bei Hengst C schwankte der Anteil an Hauptdefekten während des ganzen Versuchs auf einem hohen gleich bleibendem Niveau (80-90%). Bei allen drei Kontrolltieren blieb der hohe Anteil an Hauptdefekten während der ganzen Versuchsdauer ohne wesentliche Veränderungen bestehen (Abb. 11b).

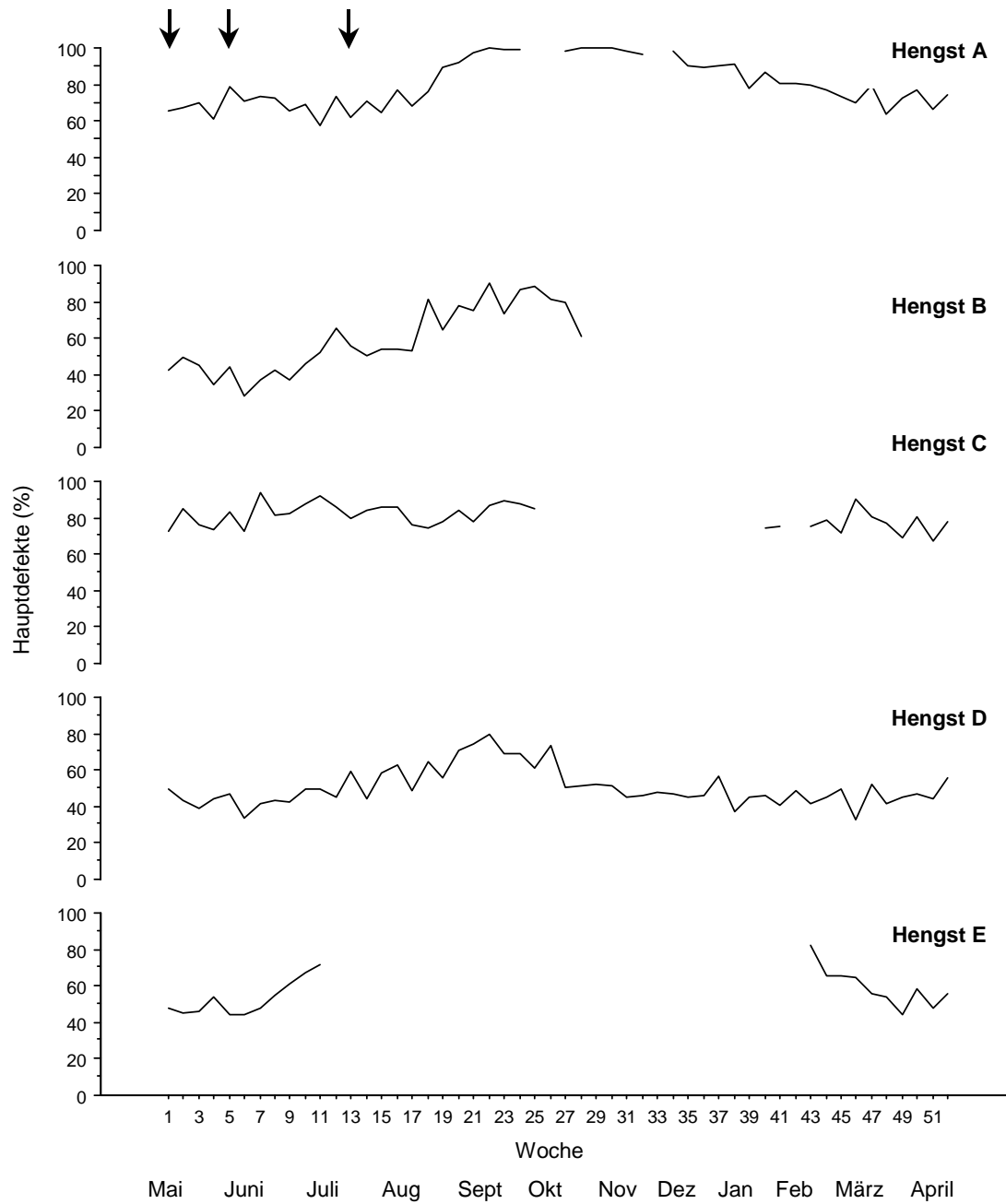




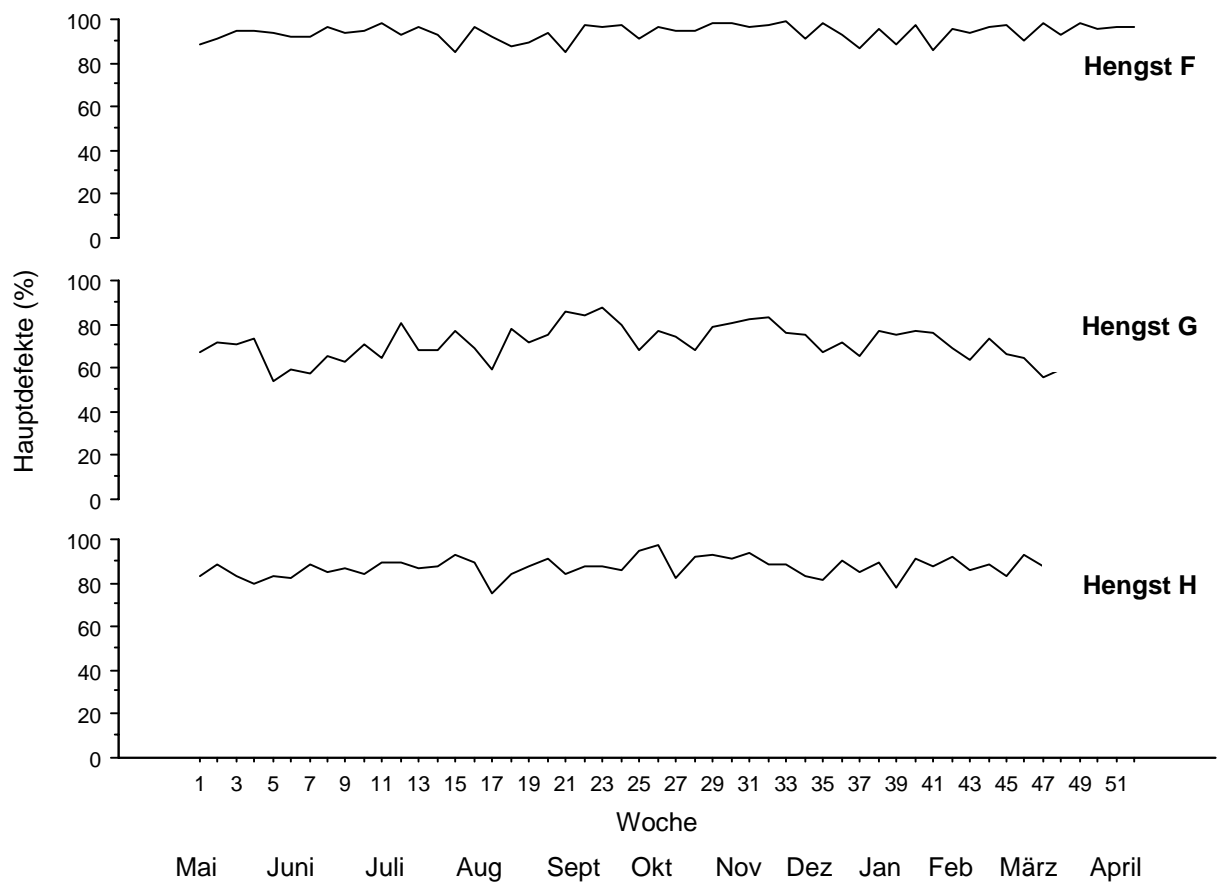
**Abbildung 10a:** Verläufe morphologisch normaler Samenzellen bei fünf geimpften Hengsten. Pfeile stellen die Applikation von EquiTy® dar.



**Abbildung 10b:** Verläufe morphologisch normaler Samenzellen bei drei Kontrolltieren.



**Abbildung 12a:** Verläufe der Hauptdefekte von Samenzellen bei fünf geimpften Hengsten. Pfeile stellen die Applikation von Equi<sup>®</sup> dar.



**Abbildung 12b:** Verläufe der Hauptdefekte von Samenzellen bei drei Kontrolltieren.

### **5.6. Verhalten und Libido**

Im Vergleich zu den Kontrolltieren, die während der ganzen Untersuchungsdauer ein normales, unverändertes Sexualverhalten und in der Sprunghalle innerhalb von 1-3 Minuten eine Erektion zeigten sowie beim 1. Sprung ejakulierten, beeinflusste die GnRH-Impfung Verhalten und Libido bei allen geimpften Hengsten in ganz unterschiedlichem Ausmass.

Mit Ausnahme von Hengst D, bei dem die Impfung keine deutlichen Veränderungen im Geschlechtsverhalten bewirkte, zeigten die vier übrigen Hengste unterschiedlich lang anhaltende Hemmung bezüglich Erektion und Ejakulation. Bei zwei Hengsten war die Erektion in den Wochen 20 bis 40 deutlich verzögert und Ejakulate konnten bei Hengst A nur nach mehreren Sprüngen und bei Hengst C in den Wochen 26-42 gar nicht gewonnen werden. Gegen Versuchsende stellte sich bei beiden Tieren wieder ein normales Geschlechtverhalten ein. Bei den Hengsten B und E konnte schon kurze Zeit nach der 3. Impfung ein zunehmendes Desinteresse gegenüber Stuten festgestellt werden. Dieser Zustand hielt bei Hengst B von Woche 29 bis Versuchsende und bei Hengst E von Woche 12 bis 42 ohne Gewinnung eines Ejakulates an.

### **5.7. Wirkungseintritt und Reversibilität**

Aufgrund der unter Kapitel 2.8. erwähnten Bedingung betreffend Wirkungseintritt kann festgehalten werden, dass mit Ausnahme von Hengst C die Impfwirkung gemessen am Abfall von Testosteron  $< 0.1$  ng/ml Plasma bei den 4 übrigen geimpften Tieren innerhalb von drei Wochen nach der 2. Impfung eingetreten ist. Bezüglich Reversibilität erfüllten bei Versuchsende nur die beiden Hengste A und E ab den Wochen 34 bzw. 43 die unter Material und Methoden definierten Kriterien. Die Hengste B und D hingegen, erfüllten selbst ein Jahr nach Impfbeginn nicht alle Bedingungen im Hinblick auf die Reversibilität.

## 6. Diskussion

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen, dass eine 3-malige Verabreichung der anti-GnRH-Vakzine Equity® bei adulten Hengsten auf die Testosteronsekretion, die Hodengrösse sowie die Samenqualität und das Sexualverhalten eine individuell unterschiedliche Wirkung hatte. Unerwünschte Nebenwirkungen traten nur bei zwei Tieren in Form einer geringgradigen, vorübergehenden Hautschwellung an der Injektionsstelle auf.

Beim Pferd wurden Immunisierungsversuche gegen GnRH erstmals von Schanbacher und Pratt (1985) beschrieben. Nach 5 Injektionen einer GnRH-Vakzine fanden die Autoren bei einem 3-jährigen kryptorchiden Hengsten einen starken Abfall der Blutkonzentrationen von LH und Testosteron, die sich erst 4 Monate nach der letzten Boosterinjektion wieder erholten. Aus dieser Beobachtung schlossen die Autoren, dass sich eine Impfung gegen GnRH zur Kontrolle des Hengstverhaltens bei kryptorchiden Tieren gut eignen würde. Einige Jahre später untersuchten Dowsett et al. (1991) die Testosteronsekretion und das Hodenwachstum bei vier 1-jährigen Junghengsten nach zwei Injektionen eines GnRH-Ovalbumin-Konjugates im Abstand von 11 Wochen. Die Testosteronkonzentration im Blut und die Hodenentwicklung blieben während rund 28 Wochen unterdrückt. Aufgrund der öligen Komponente der Vakzine waren jedoch an der Injektionsstelle starke Hautreaktionen aufgetreten, was durch Herstellung einer wasserlöslichen GnRH-Vakzine vermieden werden konnte (Dowsett et al., 1996). Verglichen mit der öligen Vakzine zeigten Versuche mit dem wasserlöslichen GnRH-Konjugat eine individuell grössere Streuung der Immunreaktion sowie eine verkürzte Unterdrückung der Hodenfunktion zwischen 12-26 Wochen. In unserer Studie konnten wir zeigen, dass bei 3-maliger Impfung mit Equity® die Testosteronwerte bei 4 von 5 Hengsten während mindestens 24 Wochen unterdrückt blieben, wobei 2 Hengste (B, D) während 45 Wochen bis zum Ende des Versuches anhaltend tiefe Testosteronkonzentrationen aufwiesen. Bei Hengst C, der mit dem geringsten Antikörperanstieg reagierte, bewirkte die 3-malige Impfung während der ganzen Versuchsdauer keinen Abfall der Testosteronkonzentrationen.

Zu einer differenzierteren Anschauung unter Berücksichtigung mehrerer Fruchtbarkeitsparameter gelangten Malmgren et al. (2001), die bei 3 adulten

Hengsten die Wirkung einer 5 mal applizierten GnRH-Impfung auf den Plasma-Testosterongehalt, den Antikörpertiter, das Geschlechtsverhalten sowie die Samenqualität und Hodenmorphologie untersuchten. Vier Wochen nach der 1. Impfung konnte eine Abnahme des Testosterons und der Libido und einen Monat später eine deutliche Verschlechterung der Samenqualität (Motilität, Morphologie, Gesamtspermienzahl) bei 2 Hengsten beobachtet werden. Das dritte Tier zeigte einen nur geringen Anstieg des Antikörpertiters und in der Folge waren auch die gemessenen Parameter nur unwesentlich verändert. Obwohl nur 3 Hengste geimpft wurden und deshalb eine Verallgemeinerung der Befunde nicht zulässig ist, lassen diese zusammen mit unseren Ergebnissen erkennen, dass mittels GnRH-Impfung eine Unterdrückung der Hodenfunktion möglich ist, die Wirkung auf die verschiedenen Messgrößen jedoch sehr individuell ausfallen kann.

Es ist bekannt, dass die Wirksamkeit einer GnRH-Vakzine in erster Linie von der Höhe und der Dauer des Antikörpertiters nach der Impfung abhängt und dass die Immunantwort wiederum durch eine Reihe von Faktoren wie Zusammensetzung des Antigens (Trägerprotein, Adjuvans), Anzahl applizierter Boosterinjektionen sowie Alter und Tierart beeinflusst werden kann. Malmgren et al. (2001) konnten zum Beispiel bei einem von 3 Hengsten selbst nach 5-maliger Impfung keinen deutlichen Titeranstieg erreichen und in unserer Studie reagierten nur 4 von 5 Hengsten mit einer deutlichen Zunahme der Antikörperproduktion nach 3-maliger Immunisierung. Hengst C zeigte einen nur moderaten Antikörperanstieg. Bezüglich zu impfender Tierart haben zum Beispiel Untersuchungen mit Improvac<sup>®</sup>, einer speziell für das Schwein konzipierten anti-GnRH-Vakzine (Dunshea et al., 2001; Jaros et al., 2005) gezeigt, dass die Anwendung dieses Impfstoffes beim Pferd (Imboden et al., 2006) zu starker Schwellung an der Injektionsstelle, Apathie und Fieber führen kann. Ein Vergleich obiger Untersuchungen zeigt auch, dass Junghengste (Dowsett et al., 1991; 1996) in der Regel mit einer zuverlässigeren Immunantwort reagieren als adulte Tiere (Clement et al., 2005; Turkstra et al., 2005). Dies dürfte denn auch ein weiterer Grund für die oft beobachteten grossen individuellen Unterschiede nach einer GnRH-Impfung sein. Dieser Sachverhalt kommt in der Studie von Clement et al. (2005) noch deutlicher zum Ausdruck. Nach viermaliger Impfung gegen GnRH haben die Autoren bei 8 adulten Hengsten ganz unterschiedliche Effekte beobachtet: Nur die Hälfte der Tiere reagierte mit einem deutlichen Antikörperanstieg (sog. good-

responders) sowie mit tiefen Testosteronwerten und einer verminderten Samenqualität. Die Libido jedoch, blieb bei allen Hengsten unverändert und bestätigt die Ergebnisse einer ähnlichen Untersuchung von Turkstra et al. (2005), die nur bei 2 von insgesamt 8 geimpften Pony-Hengsten eine reduzierte Libido fanden.

Obwohl der Antikörpertiter und die damit verbundene Hemmung der Testosteronsekretion den Erfolg der Impfung wesentlich mitbestimmt, sind die Zusammenhänge zwischen Titerverlauf bzw. Testosteronkonzentration und Unterdrückung der Geschlechtsfunktion nicht immer klar ersichtlich. Insbesondere die Ausprägung des Sexualverhaltens scheint in vielen Fällen ohne klaren Bezug zur Impfung zu stehen. Zum Beispiel wurde in unserer Studie die Libido von Hengst C bei tiefen Antikörpertitern und normalen Testosteronwerten stark gehemmt, während Hengst D mit den höchsten Titern und starker Hemmung der Testosteronsekretion keine wesentlichen Veränderungen in der Libido erkennen liess. Über schwierig zu interpretierende Ergebnisse berichten auch Clement et al. (2005) in deren Studie keiner von 8 geimpften Hengste eine verringerte Libido zeigte und in der Untersuchung von Turkstra et al. (2005) äusserten nur 2 von 8 geimpften Ponyhengsten ein reduziertes Sexualverhalten, das eine Samengewinnung zeitweise verunmöglichte. Es scheint also, dass beim Hengst die Kontrolle des Geschlechtsverhaltens nach GnRH-Impfung trotz vorhandenem Antikörpertiter schwieriger zu erreichen ist, als die Unterdrückung der Hodenfunktion. Dies dürfte damit zusammenhängen, dass zur Ausbildung und Aufrechterhaltung des männlichen Geschlechtstriebes neben hormonalen Einflüssen auch erlernte Verhaltensweisen eine wichtige Rolle spielen (Stout, 2005). So ist bekannt, dass ältere Hengste, die schon häufig gedeckt haben, auch nach chirurgischer Kastration weiterhin ein unerwünschtes männliches Sexualverhalten zeigen können. Umgekehrt haben Imboden et al. (2006) selbst zwei Jahre nach Impfung von Stuten mit Improvac<sup>®</sup> noch immer zirkulierende Antikörper nachweisen können, obwohl die Stuten ihre zyklische Ovaraktivität viel früher wieder aufgenommen hatten.

Da aufgrund der Zusammensetzung und Dosierung des Antigens sowie der Anzahl Boosterinjektionen und des Alters der Tiere ein Vergleich zwischen verschiedenen Studien beim Hengst schwierig ist, ist die Tatsache wichtig, dass die endokrine Hodenfunktion sowie die verschiedenen Samenqualitätsparameter bei allen mit



GnRH geimpften Tieren nach unterschiedlich langer Hemmung wieder reversibel waren. In unseren Untersuchungen konnten wir beobachten, dass sich Testosteron und die Samenqualität, bei 3 Hengsten noch vor Versuchsende (1 Jahr nach Impfbeginn) normalisierten, während die übrigen beiden Hengste an ihre Besitzer zurückgingen und wenige Monate später ebenfalls als normal fruchtbar bezeichnet wurden. Von Hengst A und E ist zudem bekannt, dass sie im Jahr nach Studienende wieder in den Zuchteinsatz kamen und sich als Fruchtbar erwiesen.

Die Unterdrückung der Testosteronproduktion bei 4 von 5 Hengsten während mindestens 24 Wochen nach Impfbeginn weist drauf hin, dass im Vergleich zu anderen Studien (Malmgren et al., 2001; Stout und Colenbrander, 2004; Clement et al., 2005) die spezifisch für das Pferd konzipierte anti-GnRH-Vakzine Equity® sich nach 3-maliger Applikation durch hohe Zuverlässigkeit und Wirksamkeit auszeichnet. Auch die deutliche Abnahme der Hodengrösse und Samenqualität während mindestens 6 Monaten zeigt die langanhaltende Wirkung, obwohl eingeräumt werden muss, dass die Spermatogenese beim Hengst mit diesem Impfschema nicht vollständig blockiert wurde. Dies wird damit erklärt, dass durch die Impfung FSH weniger stark gehemmt wird als LH (Thompson, 2000), sodass geringe im Blut zirkulierende FSH Mengen zusammen mit wenig Testosteron noch ausreichen, die Spermatogeneseaktivität aufrechtzuerhalten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Equity® als eine wirkungsvolle, sowie schonende und reversible anti-GnRH-Impfung zur temporären (mind. 6 Monate) Unterdrückung der Geschlechtsfunktion beim Hengsten mit grosser Zuverlässigkeit und wenig Nebenwirkungen verwendet werden kann. Damit besteht auch eine Alternative zur chirurgischen Kastration, ohne die Zuchtkarriere wertvoller Hengste irreversibel beenden zu müssen. Weiterführende Fragen zu Langzeiteffekten durch jährliche Boosterinjektionen oder Auswirkungen der Impfung auf die Körpergrösse bei heranwachsenden Junghengsten müssen in neuen Projekten abgeklärt werden. In Bezug auf Doping- oder Manipulationsvorschriften ist zu bemerken, dass grundsätzlich nur Impfungen zur Verhinderung infektiöser Krankheiten zugelassen sind. Zudem sind im Rennsport für die klassischen Rennen der Dreijährigen ausschliesslich Stuten und Hengste zugelassen.

## 7. Appendix

### 7.1. Hancock Lösung

Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ )	6.19 g
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	2.54 g
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	5.41 g
Formaldehydlösung 36-37 %	125 ml
Aqua bidest.	Ad 1'000 ml

## 7.2. Morphologisches Klassifikationsschema

Hengst:

Datum der Samengewinnung:

Datum der Untersuchung:

### Hauptdefekte Kopf

### Nebendefekte Kopf

1.	<b>Unterentwickelte/Teratoide Formen</b> (Schwanz um den Kopf, degenerierte Köpfe)	16.	<b>Schmale Köpfe</b>
2.	<b>Doppelformen</b> (Mehrere Köpfe-, Mittelstücke-, Schwänze-, akkzess. Schwänze)	17.	<b>Kleine normale Köpfe</b>
3.	<b>Akrosomdefekt</b> (Krater, Knopf)	18.	<b>Riesenköpfe/kurze Köpfe</b> (gefaltete Köpfe, gerollte Köpfe)
4.	<b>Decapitationsdefekt</b> (bewegliche Schwänze)	19.	<b>Lose normale Köpfe</b>
5.	<b>Diademdefekt/Vakuolen</b>	20.	<b>Verlust/Loslösung Kopfkappe</b>
6.	<b>Birnenförmige Köpfe</b>	21.	<b>Abaxialer Schwanzansatz</b>
7.	<b>Schmale Kopfbasis</b> (ausgestülpte Kopfbasis)	<b>Bemerkungen Kopf</b>	
8.	<b>Abnormale Kontur/Form</b> (lanzen-, kolben-, spatenförmige Köpfe)		
9.	<b>Kleine abnormale Köpfe</b> (Zwergköpfe)		
10.	<b>Lose abnormale Köpfe</b>		

### Hauptdefekte Schwanz

### Nebendefekte Schwanz

11.	<b>Korkenzieherdefekt</b>	22.	<b>Distaltropfen</b>
12.	<b>Andere Mittelstückdefekte</b> (tail stump, Kerben, Mitoch.-Verl., aufgespl., gefalt., verb., gebr., parax., Retrofl.)	23.	<b>Schlingen</b> (Tropfen mit Verbiegung)
13.	<b>Proximaltropfen</b>	24.	<b>Am Ende aufgerollter Schwanz</b> (Ende um Tropfen gerollt)
14.	<b>Pseudotropfen</b>	<b>Bemerkungen Schwanz</b>	
15.	<b>Gefaltete oder gekrümmte Schwänze</b> (Dag, Dag-ähnlich, Schnörkel, Notenschl., rudiment.)		

### Normale Spermien


### Fremdzellen (0 bis +++)

Spermaentwicklungs-	Spindelförmige-	Medusa-	Epithelzellen	Erythrozyten	Leukozyten

### Beurteilung Morphologie

Beurteilte Spermien	Normale Spermien	Hauptdef	Akrosomdef	Vakuolen	Lose Köpfe	Abnormale Köpfe	Proximaltropfen	Mittelstückdef	Schwanzdef
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)

Bemerkungen:

---

## 8. Literaturverzeichnis

Adams T. E., Daley C. A., Adams B. M., Sakurai H.: Testes function and feedlot performance of bulls actively immunized against Gonadotropin-Releasing Hormone: Effect of age at immunization. *J. Anim. Sci.* 1996, 74: 950-954.

Bonneau M., Dufour R., Chouvet C., Roulet C., Maedus W., Squires E. J.: The effects of immunization against luteinizing hormone-releasing hormone on performance, sexual development, and levels of boar taint-related compounds in intact male pigs. *J. Anim. Sci.* 1994, 72: 14-20.

Brinsko S. P., Squires E. L., Pickett B. W., Nett T. M.: Gonadal and pituitary responsiveness of stallions is not down-regulated by prolonged pulsatile administration of GnRH. *J. Androl.* 1998, 19: 100-109.

Burger D., Janett F., Imboden I., Zientara S., Timoney P., Thun R.: Treatment of an equine arteritis virus-shedding stallion by immunization against GnRH. In: 15th Internat. Congr. Anim. Reprod. 2004, vol.1, Porto Seguro, 281.

Burger D., Janett F., Vidament F., Stump R., Fortier G., Imboden I., Thun R.: Immunization against GnRH in adult stallions: Effects on semen characteristics, behaviour and shedding of equine arteritis virus. *Proc. 9th Internat. Symp. Equine Reprod.* 2006, Kerkrade. *Anim. Reprod. Sci.* 94, 107-111.

Caraty A., Bonneau M.: Effect of active immunization against gonadorelin on LH and FSH secretion and the fat androstenone level in entire male pigs. *C. R. Acad. Sci. Paris Ser. D.* 1986, 303: 673-676.

Clement F., Vidament M., Daels P., Van der Meer F., Larry J.L., Colenbrander B., Turkstra J.: Immunocastration in stallions: effect on spermatogenesis and behaviour. *Proc. 4th Internat. Symp. on Stallion Reprod.* 2005, Hannover. *Anim. Reprod. Sci.* 89, 230-233.

Cook R. B., Popp J. D., Kastelic J. P., Robbins S., Harland R.: The effects of active immunization against GnRH on testicular development, feedlot performance and carcass characteristics of beef bulls. *J. Anim. Sci.* 2000, 78: 2778-2783.

D'Occhio M. J.: Immunological suppression of reproductive functions in male and female mammals. *Anim. Reprod. Sci.* 1993, 33: 345-372.

D'Occhio M. J., Aspden W. J., Trigg T. E.: Sustained testicular atrophy in bulls actively immunized against GnRH: potential to control carcass characteristics. *Anim. Reprod. Sci.*, 2001, 66: 47-58.

Dowsett K. F., Pattie W. A., Knott L.M., Jackson A. E., Hoskinson R. M., Rigby R. P. G., Moss B. A.: A preliminary study of immunological castration in colts. *J. Reprod. Fertil.* 1991, Suppl. 44: 183-190.

Dowsett K. F., Knott L. M., Tshewang U., Jackson A. E., Boderro D. A. V., Trigg T. E.: Suppression of testicular function using two dose rates of a reversible water soluble gonadotrophin releasing hormone (GnRH) vaccine in colts. *Aust. Vet. J.* 1996, 74: 228-235.

Dunshea F. R., Colantoni C., Howard K., McCauley I., Jackson P., Long K. A., Lopaticki S., Nugent E. A., Simons J. A., Walker J., Hennessy D. P.: Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance. *J. Anim. Sci.* 2001, 79: 2524-2535.

Elhay M., Newbold A., Britton A., Turkley P., Dowsett K., Walker J.: Suppression of behavioural and physiological oestrus in the mare by vaccination against GnRH. *Aust. Vet. J.* 2007, 85: 39-45.

Falvo R. E., Chandrashekar V., Arthur R. D., Kuenstler A. R., Hasson T., Awoniyi C., Schanbacher B. D.: Effect of active immunization against LHRH or LH in boars: reproductive consequences and performance traits. *J. Anim. Sci.* 1986, 63: 944-986.

Fayer-Hosken R. A., Grobler D., Van Altena J. J., Bertschinger H. J., Kirkpatrick J. F.: Immunocontraception of African elephants. *Nature* 2001, 411:766.

---

Fortier G., Vidament M., DeCraene F., Ferry B., Daels P. F.: The effect of GnRH antagonist on testosterone secretion, spermatogenesis and viral excretion in EVA-virus excreting stallions. *Theriogenology* 2002, 58: 425-427.

Finnerty M., Enright W. J., Morrison C. A., Roche J. F.: Immunization of bull calves with a GnRH analogue-human serum albumin conjugate: effect of conjugate dose, type of adjuvant and booster interval on immune, endocrine, testicular and growth responses. *J. Reprod. Fertil.* 1994, 101: 333-343.

Hurtgen J. P.: Evaluation for stallion for breeding soundness. *Equine Practice* 1992, 8: 149-165.

Imboden I., Janett F., Burger D., Crowe M. A., Hässig M., Thun R.: Influence of immunization against GnRH on reproductive cyclicity and estrous behavior in the mare. *Theriogenology* 2006, 66: 1866-1875.

Janett F., Lanker U., Jörg H., Hässig M., Thun R.: Die Kastration männlicher Lämmer mittels Immunisierung gegen GnRH. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 2003, 145: 291-299.

Jaros P., Bürgi E., Stärk K. D. C., Claus R., Hennessy D., Thun R.: Effect of active immunization against GnRH on androstenone concentration, growth performance and carcass quality in intact male pigs. *Livest. Prod. Sci.* 2005, 92: 31-38.

Jeffcoate I. A., Lucas J. M. S., Crighton D. B.: Effects of active immunization of ram lambs and bull calves against synthetic luteinizing hormone releasing hormone. *Theriogenology* 1982, 18: 65-67.

Kellewald V.: Untersuchungen zur laparoskopischen Kastration des Hengstes. Dissertation, Universität München, 2005.

Ladd A., Tsong Y. Y., Walfield A. M., Thau R. B.: Development of an antifertility vaccine for pets based on active immunization against luteinizing hormone-releasing hormone. *Biol. Reprod.* 1994, 51: 1076-1083.

Levy J. K., Miller L. A., Crawford P. C., Ritchey J. W., Ross M. K., Fagerstone K. A.: GnRH immunocontraception of male cats. *Theriogenology* 2004, 62: 1116-1130.

Lincoln G. A., Fraser H. M.: Blockade of episodic secretion of luteinizing hormone in the ram by the administration of antibodies to luteinizing hormone releasing hormone. *Biol. Reprod.* 1979, 21: 1239-1245.

Line S. W., Hart B. L., Sanders L.: Effect of prepubertal versus postpubertal castration on sexual and aggressive behaviour in male horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1985, 186: 249-251.

Malmgren L., Andresen Ø., Dalin A.M.: Effect of GnRH immunisation on hormonal levels, sexual behaviour, semen quality and testicular morphology in mature stallions. *Equine vet. J.* 2001, 33: 75-83.

McDonnell S.: Stallion behaviour problems. In: *Current Therapy in Equine Medicine*. Ed. N. E. Roinson, Saunders, London, 2003, 317-319.

Perkins N. R.: Reproductive management. In: *Equine sports medicine and surgery*. Eds. K. W. Hinchcliff, A. J. Kaneps and R. J. Geor, Saunders, Philadelphia, 2004, 1193-1200.

Robertson I. S., Wilson J. C., Fraser H. M.: Immunological castration in male cattle. *Vet. Rec.* 1979, 105: 556-557.

Robertson I. S., Fraser H. M., Innes G. M., Jones A. S.: Effect of immunological castration on sexual and production characteristics in male cattle. *Vet. Rec.* 1982, 111: 529-531.

Roser J. F., Hughes J. P.: Prolonged pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) to fertile stallions *J. Reprod. Fert. Suppl.* 44, 1991, 155-168.

Sieme H., Troedsson M. H. T., Weinrich S., Klug E.: Influence of exogenous GnRH on sexual behavior and frozen/thawed semen viability in stallions during the non-breeding season. *Theriogenology* 2004, 61: 159-171.

Simms M. S., Scholfield D. P., Jacobs E., Michaeli D., Broome P., Humphreys J. E., Bishop M. C.: Anti-GnRH antibodies can induce castrate levels of testosterone in patients with advanced prostate cancer. *Br. J. Cancer* 2000, 83: 443-446.

---

Schanbacher B. D., Pratt B. R.: Response of a cryptorchid stallion to vaccination against luteinising hormone releasing hormone. Vet. Rec. 1985, 116: 74-75.

Stout T. A. E., Colenbrander B. : Suppressing reproductive activity in horses using GnRH vaccines, antagonists or agonists. Anim. Reprod. Sci. 2004, 82-83: 633-643.

Stout T. A. E.: 2005. Modulating reproductive activity in stallions: A review. Proc. 4th Internat. Symp. Stallion Reprod. Hannover. Anim. Reprod. Sci. 2005, 89: 93-103.

Thompson D.L.: Immunization against GnRH in male species (comparative aspects). Anim. Reprod. Sci. 2000, 60-61: 459-469.

Turkstra J., Van der Meer F., Knaap J., Rottier P., Teerts K., Colenbrander B., Meloen R.: Effects of GnRH immunization in sexually mature pony stallions. Anim. Reprod. Sci. 2005, 3-4: 247-259.



## 9. Dank

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir bei dieser Arbeit geholfen haben, insbesondere:

Herrn Prof. Dr. R. Thun, Klinik für Fortpflanzungsmedizin, Universität Zürich, für die Überlassung des Themas, die immense Unterstützung und die Übernahme des Referates.

Herrn Prof. Dr. F. Ehrensperger, Institut für Veterinärpathologie, Universität Zürich, für die Übernahme des Korreferates.

Herrn PD Dr. F. Janett, Klinik für Fortpflanzungsmedizin, Universität Zürich, für die riesige Unterstützung, die fachliche Leitung und Betreuung der ganzen Arbeit sowie für die Durchführung der morphologischen Untersuchungen.

Herrn Dr. P. A. Poncet, Direktor des Nationalgestütes, für die Anstellung als Assistenztierarzt, für die Infrastruktur und die Hengste.

Herrn Dr. D. Burger, Leiter der Klinik des Nationalgestütes Avenches, für die Initialisierung, Unterstützung und Koordination der Arbeit.

Herr G. Cosentino, Labormedizinisches Zentrum Dr. Risch, Liebefeld, für die Durchführung der Testosteronbestimmungen.

Ein besonderes Lob geht an die Herren H. Schwab, W. Schwab und J.P. Duc, Mitarbeiter des Nationalgestütes Avenches, für die tatkräftige Mithilfe, für die wertvollen Ratschläge und die lustigen Episoden während der Samengewinnung und -verarbeitung.

Francis Stähli, Gilbert Moret, Jean-Philip Chêne, Antonia Lempke, Julien Negri, Barbara Azethauser, Sabine Begert und Simon Stämpfli für ihre Mithilfe mit den Hengsten und im Labor.